

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

(DOKTORA TEZİ)

**PROTEİN KISITLAMASININ YAŞLANMA
SÜRECİNDEKİ SIÇANLARDA OKSİDATİF mtDNA
HASARI VE TELOMERAZ AKTİVİTESİNE
ETKİLERİ**

SEVDA TANRIKULU KÜÇÜK

**DANIŞMAN
PROF. DR. EVİN ADEMOĞLU**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI


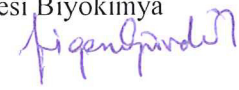
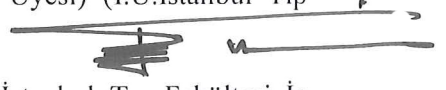


Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

05/ 10 /2010

Prof.Dr.Tamer DEMİRALP
Müdür

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Biyokimya
Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
Anabilim Dalı : Biyokimya
Tez Sahibi : SEVDA TANRIKULU KÜÇÜK
Tez Başlığı : Protein Kısıtlamasının Yaşlanma Sürecindeki Sıçanlarda Oksidatif mtDNA Hasarı ve Telomeraz Aktivitesine Etkileri
Sınav Yeri : İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 22 / 09 / 2010

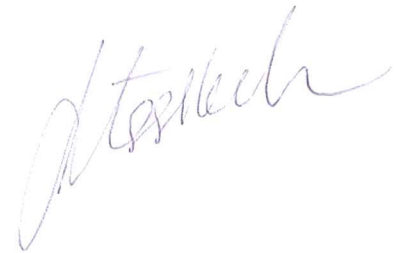
Tez Sınav Jürisi

- Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) _____ İmzası
- 1.Prof.Dr. Müjdat UYSAL (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı) 
 - 2.Prof.Dr. Figen GÜRDÖL (Tez İzleme Komitesi Üyesi) (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı) 
 - 3.Prof.Dr. Evin ADEMOĞLU (Danışman) (Tez İzleme Komitesi Üyesi) (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı) 
 - 4.Prof.Dr. Şükrü PALANDUZ (Tez İzleme Komitesi Üyesi) (İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı) 
 - 5.Doç.Dr. Hikmet KOÇAK (Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı) 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Sevda Tanırkulu Küçük



İTHAF

Sevgili annem ve babama...

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince her türlü bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, dinleyen ve değer veren, azmi, çalışkanlığı ve iş disiplini kendime örnek aldığım, tezimin her aşamasında desteğini hissettiğim, değerli hocam ve tez danışmanım **Prof. Dr. Evin ADEMOĞLU**'na;

Eğitimim süresince her türlü bilgi ve deneyimiyle yol gösteren, engin tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen başta Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Müjdat UYSAL** ve **Prof. Dr. Figen GÜRDÖL** olmak üzere Biyokimya Anabilim Dalının değerli hocalarına;

Tezimin bazı aşamalarının gerçekleştirilmesinde değerli yardımları bulunan İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan **Doç. Dr. Zehra Oya UYGUNER** ve çalışma arkadaşlarına, Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden **Doç. Dr. Müge TÜRET SAYAR**'a,

Dr. Canan KÜÇÜKGERGİN başta olmak üzere birlikte çalışma fırsatı bulduğum tüm asistan arkadaşlarıma ve Biyokimya Anabilim Dalı personeline;

Beni yetiştiren ve bir ömür boyu sonsuz desteklerini ve sevgilerini benden esirgemeyen sevgili anne ve babama, tezimi tamamlarken bana sonsuz sabır gösteren ve destek veren sevgili eşime ve kızıma en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 61/15122006

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İİX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. YAŞLANMA	5
2.1.1. Yaşlanma Teorileri.....	6
2.2. SERBEST RADİKALLER	11
2.2.1. Serbest Radikallerin HücreSEL Makromoleküllere Etkileri	15
2.3. TELOMERLER VE TELOMERAZ	19
2.3.1. Telomerler	19
2.3.2. Telomeraz.....	20
2.4. TELOMER UZUNLUĞU VE TELOMERAZ İLE YAŞLANMA ARASINDAKİ İLİŞKİ	23
2.5. YAŞLANMA ÜZERİNE BESLENMENİN ETKİLERİ	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. KULLANILAN GEREÇLER	31
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER.....	32
3.3. YÖNTEM.....	33
3.3.1. Deney Hayvanları Hazırlanması ve Çalışma Protokolü.....	33
3.3.2. Karaciğer Dokusunda Yapılan İncelemeler	36
3.3.3. Karaciğer Homojenatının Hazırlanması	36
3.3.4. Karaciğer Dokusundan Mitokondri Eldesi	36

3.3.5. Karaciğer Homojenati ve Mitokondride Süperoksit Salınımının Tayini	37
3.3.6. Karaciğer Homojenati ve Mitokondride Peroksit Salınımının Tayini	38
3.3.7. Karaciğer Homojenati ve Mitokondride Protein Karbonil Düzeyinin Tayini ..	39
3.3.8. 8-OHdG Düzeyi Tayini	41
3.3.9. Telomeraz Aktivitesi Tayini.....	44
3.3.10. Telomer Uzunluğunun Tayini.....	48
3.3.11. Protein Düzeyinin Tayini	54
3.4. İSTATİSTİKİ ANALİZLER.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. KARACİĞER HOMOJENATI VE MİTOKONDRİSİNDE SÜPEROKSİT SALINIMI İLE İLGİLİ BULGULAR	57
4.2. KARACİĞER HOMOJENATI VE MİTOKONDRİSİNDE PEROKSİT SALINIMI İLE İLGİLİ BULGULAR	59
4.3. KARACİĞER HOMOJENATI VE MİTOKONDRİDE PROTEİN KARBONİL DÜZEYİ İLE İLGİLİ BULGULAR.....	61
4.4. KARACİĞERDE GENOMİK VE MİTOKONDRİYAL DNA 8-OHdG DÜZEYLERİ İLE İLGİLİ BULGULAR	63
4.5. KARACİĞER TELOMERAZ AKTİVİTESİ VE TELOMER UZUNLUĞU İLE İLGİLİ BULGULAR	65
5. TARTIŞMA	68
KAYNAKLAR	73
FORMLAR	88
ETİK KURUL KARARI	89
PATENT HAKKI İZİNİ	90
TELİF HAKKI İZİNİ.....	91
ÖZGEÇMİŞ	92

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Biyolojik sistemlerde sık karşılaşılan serbest radikaller	13
Tablo 3-1 Normal sıçan yeminin içeriği	34
Tablo 3-2 Metyonin hariç, proteini %40 kısıtlanmış sıçan yeminin içeriği	35
Tablo 4-1: Normal yem (NY) ve proteini kısıtlanmış yemle (PKY) beslenen sıçanların çalışmanın başlangıcında ve 4. aydaki vücut ağırlıkları.	56
Tablo 4-2: Dört ay süreyle normal yem (NY) veya proteini kısıtlanmış yemle (PKY) beslenen sıçanların karaciğer homojenatında ve mitokondrisinde süperoksit salınımı. .	57
Tablo 4-3: Dört ay süreyle normal yem (NY) veya proteini kısıtlanmış yemle (PKY) beslenen sıçanların karaciğer homojenatında ve mitokondrisinde peroksit salınımı.	59
Tablo 4-4: Dört ay süreyle normal yem (NY) veya proteini kısıtlanmış yemle (PKY) beslenen sıçanların karaciğer homojenatında ve mitokondrisinde protein karbonil düzeyleri.....	61
Tablo 4-5: Dört ay süreyle normal yem (NY) veya proteini kısıtlanmış yemle (PKY) beslenen sıçanların karaciğerinde gDNA ve mtDNA 8-OHdG düzeyleri.....	63
Tablo 4-6: Dört ay süreyle normal yem (NY) veya proteini kısıtlanmış yemle (PKY) beslenen sıçanların karaciğerinde telomeraz aktivitesi ve telomer uzunlukları..	65

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Mitokondriyal Yaşlanma Teorisi	10
Şekil 2-2: Elektron transport zincirinde serbest oksijen radikalleri oluşumu ve etkileri	15
Şekil 2-3: Hücre içi lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonları	16
Şekil 2-4: 8-hidroksi-2-deoksiguanin (8-OHdG).....	19
Şekil 2-5: Telomeraz tarafından telomer boyunu uzatılmasının şematik gösterimi.	22
Şekil 2-6: Hücre Siklusu	25
Şekil 3-1: Luminol ile oluşan kemiluminesans reaksiyonları.....	38
Şekil 3-2: Telomeraz aktivitesi tayininin şematik gösterimi	44
Şekil 3-3: DNA bantlarının gümüş boyama tekniği ile elde edilen görüntüsü.	47
Şekil 3-4: Telomer uzunluğu tayininin şematik gösterimi.....	49
Şekil 3-5: DNA parçalarının membrana blotlanması işleminin şematik gösterimi	52
Şekil 4-1: Yaşlanma sürecindeki sıçanlarda protein kısıtlamasının karaciğer homojenatında (A) ve karaciğer mitokondrisinde (B) süperoksit salınımına etkisi. ...	58
Şekil 4-2: Yaşlanma sürecindeki sıçanlarda protein kısıtlamasının karaciğer homojenatında (A) ve karaciğer mitokondrisinde (B) peroksit salınımına etkisi.....	60
Şekil 4-3: Yaşlanma sürecindeki sıçanlarda protein kısıtlamasının karaciğer homojenatında (A) ve karaciğer mitokondrisinde (B) protein karbonil düzeylerine etkisi.....	62
Şekil 4-4: Yaşlanma sürecindeki sıçanlarda protein kısıtlamasının karaciğerde gDNA (A), mtDNA (B) 8-OHdG düzeylerine etkisi.	64
Şekil 4-5: Yaşlanma sürecindeki sıçanlarda protein kısıtlamasının karaciğerde telomeraz aktivitesi (A), telomer uzunluğuna (B) etkisi.	66
Şekil 4-6: NY ve PKY ile beslenen sıçanların telomer uzunluklarının Southern Blot yöntemiyle elde edilen görüntüleri;	67

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

5-OHdC: 5-hidroksi-2-deoksisitidin

5-OHdU: 5-hidroksi-2-deoksiurasil

8-OHdA: 8-hidroksi-2-deoksiadenin

8-OHdG: 8-hidroksi-2-deoksiguanozin

amol: Attomol

DHEA: Dihidroepiandrosteron

DNA: Deoksiribonükleik asit

ETZ: Elektron transport zinciri

gDNA: genomik DNA

GPx: Glutasyon peroksidaz enzimi

H₂O₂: Hidrojen peroksit

hTERT: İnsan telomeraz enziminin reverse transkriptaz aktivitesine sahip alt birimi

hTR: İnsan telomeraz enziminin RNA yapıdaki alt birimi

M1: Mortalite evresi 1

M2: Mortalite evresi 2

mtDNA: mitokondriyal DNA

NY: Normal yem

O₂^{•-}: Süperoksit radikali

PKY: Metyonin hariç, proteini %40 kısıtlanmış yem

ROS: Reaktif oksijen türleri

SOD: Süperoksit dismutaz enzimi

TP1: Telomeraz enziminin protein yapıdaki alt birimi

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

ÖZET

Tanrikulu-Küçük S. Protein Kısıtlamasının Yaşlanma Sürecindeki Sıçanlarda Oksidatif mtDNA Hasarı Ve Telomeraz Aktivitesine Etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2010.

Yaşlanma, organizmanın fonksiyonlarında azalma ve ölüm riskinde artma ile seyreden kümülatif ve ilerleyici bir süreçtir. Yaşlanmanın nedenini açıklamaya yönelik teorilerin bazıları, yaşlanmada mitokondriyal oksidatif stresin anahtar rol oynadığını ileri sürerken, diğer bir teoride yaşlanmanın telomer boyunun kısalmasıyla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Yaşlanmanın yavaşlatılması veya önlenmesini sağladığı bilinen en güçlü deneysel yöntem besin kısıtlamasıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda besin kısıtlaması yerine bazı besin öğelerinin kısıtlanmasının da mitokondride oksidatif protein ve DNA hasarını önleyerek yaşlanmayı yavaşlattığı bildirilmiştir. Çalışmamızda metyonin hariç, proteini %40 azaltılmış yemle (PKY) beslenmenin yaşlanma sürecindeki sıçanların karaciğerinde oksidatif DNA ve protein hasarı ile telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesine etkileri incelendi. Bu amaçla 4 ay süreyle PKY ile beslenen 12 aylık Wistar Albino sıçanların karaciğer homojenatında ve mitokondri fraksiyonunda süperoksit ve peroksit salınımı, protein karbonil düzeyleri, genomik ve mitokondriyal DNA'da 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri ile telomeraz aktivitesi ve telomer uzunlukları tayin edildi.

PKY uygulaması, kalori ve metyonin kısıtlaması çalışmalarına benzer şekilde, sıçanların karaciğerinde yaşın ilerlemesiyle mitokondriyal süperoksit salınımı ile mtDNA 8-OHdG düzeylerinde ortaya çıkan artışın önlenmesinde etkili olurken, peroksit salınımı ve protein karbonil düzeylerini etkilememiştir. Besin kısıtlamasının telomeraz aktivitesi ve telomer boyuna etkilerini inceleyen bu ilk çalışmada, metyonin hariç, protein kısıtlaması uygulanan sıçanların telomeraz aktiviteleri ve telomer uzunluklarının normal yemle beslenen akranlarından farklı olmadığı saptanmıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlar, metyonin hariç proteini kısıtlanmış diyetin yaşlanma sürecindeki sıçanların karaciğerinde, özellikle mitokondri fraksiyonunda, protein ve DNA hasarının önlenmesinde olumlu etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Reaktif oksijen bileşiklerinin üretiminin ve oksidan hasarın önlenmesinde, metyonin dışındaki diğer amino asitlerin besinle alınan miktarlarının azaltılmasının da önemli katkısı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yaşlanma, Protein kısıtlaması, Mitokondriyal DNA, Telomer, Oksidatif stres,

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 61/15122006

ABSTRACT

Tanrikulu-Kucuk S. The Effects Of Protein Restriction On Oxidative mtDNA Damage And Telomerase Activity In Rats During Aging. İstanbul University, Institute of Health Science, İstanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Biochemistry. Doctorate Thesis. İstanbul. 2010.

Aging is a cumulative and progressive process that decreases functional capacities and increases the probability of degenerative diseases and death. While some theories of aging indicate the importance of mitochondrial oxidative stress role in aging, a new theory has focused on telomere shortening. Calorie restriction is the most powerful experimental manipulation slow down aging. Recently, it was suggested that instead of calorie restriction, variations in the proportions of some of the main dietary components can also affect longevity by reducing the oxidative DNA and protein damage.

In the present study, the effects of feeding with 40% protein restricted diet, except methionine (PRD) on oxidative damage and telomere length together with the telomerase activity were evaluated in the liver of rats in the course aging. Peroxide production, genomic and mitochondrial DNA 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) levels and protein carbonyl levels were measured both in liver homogenate and mitochondria in addition to liver telomerase activity and telomer length in 12 months old Wistar Albino rats that were fed with PRC for 4 months.

Similar to calorie or methionine restriction, PRC application reduced the elevated superoxide production and mtDNA 8-OHdG levels, but it did not effect peroxide production and protein carbonyl levels in the rats during aging. In this first study searching the affects of dietary restriction on telomerase activity and telomer length, our results demonstrated that telomerase activity and telomer length in rats fed with PRC were not different from the coevals fed with normal diet.

Our results indicate that PRD also has beneficial effects in the prevention of DNA and protein damage in the liver, especially in mitochondria of rats during aging. In conclusion, the restriction in dietary levels of the amino acids other than methionine may have important contributions to the reduction of ROS production and prevention of oxidative damage.

Key Words: Aging, Protein Restriction, Mitochondrial DNA, Telomere, Oxidative stress

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University.
Project No. 61/15122006

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yaşlanma, doku ve hücrelerin kendilerini yenileme, normal yapı ve fonksiyonlarını sürdürme, hasara karşı dirençli olma ve hatayı tamir edebilme yeteneklerinin kademeli olarak azaldığı doğal bir süreçtir. Prokaryotlardan kompleks ökaryotlara kadar tüm canlılarda yaşamın başladığı andan itibaren başlar ve ölümle sona erer. Bu süreçte ortaya çıkan fiziksel, psikolojik ve sosyal yetersizliklerin tamamı, zincirleme olarak gerçekleşen ve giderek artan değişimlerin bir sonucudur. Yaşlanmada genetik yapı, yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları, oksidan ve antioksidan birleşiklerin organizmadaki düzeyi, stres, uyku düzeni gibi çeşitli intrensek ve ekstrensek faktörlerin etkili olduğu ileri sürülmektedir (1).

Neden yaşıyoruz? Nasıl yaşıyoruz? Bu süreci durdurmak mümkün mü? sorularına cevap bulmak üzere *Somatik Mutasyon Teorisi*, *Serbest Radikal Teorisi*, *Mitokondriyal Teori*, *Hücre Yaşlanması ve Telomer Kısalması Teorisi*, *Nöro-endokrin Teori* gibi birçok teori ortaya atılmıştır (2,3,4,5,6). Bu teorilerden, *Yaşlanmada Serbest Radikal Teorisi* ve bu teoriye bağlı olarak ortaya atılan *Yaşlanmada Mitokondriyal Teori*, yaş ilerledikçe ortaya çıkan ve organizmada etkisini her geçen gün daha fazla hissettiren bu dejeneratif süreçten serbest radikal hasarının sorumlu olduğunu ileri sürmektedir (3,4). Bu teorilere göre normal şartlar altında sürekli olarak devam eden ROS üretimi zamanla artmakta ve bu durum elektron transport zincirinin (ETZ) fonksiyonlarında bozulma, hücre DNA'sında delesyon ve mutasyonlara neden olmaktadır. Hücrede mevcut antioksidan savunma sistemleri sürekli olarak hücreyi bu zararlı etkilerden korumaya çalışmakta, ancak yaş ilerledikçe oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki denge oksidanlar lehine değişmektedir. Bir süre sonra kısır döngü halini alan bu durum hücre ölümünü kaçınılmaz kılmakta ve bu süreç bir bütün olarak ele alındığında yaşlanmaya neden olmaktadır (7,8). İnsanlar dahil birçok canlı türünde yaşam süresiyle oksidatif stres arasındaki ters ilişkiyi ortaya koyan bulgular bu teorilerin en önemli destekleridir (9-15). Bilindiği gibi oksidatif hasarın başlıca sorumluları, aerobik metabolizma sonucu oluşan süperoksit anyonu, hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri (ROS)'dir. Hücrede üretilen ROS'un DNA, proteinler ve lipitlerde hasara yol açtığı, mitokondri bileşenleri dahil tüm hücre elemanlarının yapı ve fonksiyonunu bozarak dejeneratif süreci başlattığı gösterilmiştir (16-20). İlk kez 1980 yılında Miquel ve arkadaşları (21) mitokondriyal DNA'nın da (mtDNA) reaktif oksijen

türleri için bir hedef olduğunu ve oksidatif hasar sonucu ortaya çıkan mutasyonların yaşlanma sürecinde önemli olabileceğini ileri sürmüştür. Daha sonra yapılan çalışmalar mitokondrilerin yaşlanmada anahtar rol oynadığını ortaya koymuştur (22,23). Oksidatif hasar sonucu ortaya çıkan mtDNA mutasyonları özellikle post-mitotik hücrelerde yoğunlaşarak mtDNA replikasyonunu bloke eder ve mitokondri turnoverini azaltır (23). Mutasyona uğramış DNA içeren, disfonksiyonel mitokondrilerin varlığı, fizyolojik yaşlanma yanı sıra Alzheimer hastalığı, Diabetes Mellitus, progresif kas hastalıkları optik sinir dejenerasyonu ve kanser gibi prematür yaşlanma semptomlarıyla seyreden ve insidansı yaş ilerledikçe artan hastalıklarda da gösterilmiştir (24).

Yaşlanmanın mekanizmasını açıklamaya yönelik çalışmalar, yaşlanmanın yavaşlatılması veya önlenmesine yönelik çalışmalara da hız vermiştir. Bu amaçla yapılan deneysel uygulamalardan kalori kısıtlamasının (esansiyel besinlerin yeterli düzeylerde alınması kaydı ile günlük alınan besin miktarının azaltılması), laboratuvar kemirgenleri dahil birçok hayvan türünde ve insanlarda yaşlanmayı yavaşlatan ve maksimum yaşam süresini uzatan en güçlü uygulama olduğu görülmüştür (25,26,27). Kalori kısıtlamasının yaşlanmayı geciktirici etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte serbest radikallerin oluşumunu azalttığı yönünde çok sayıda bilgi bulunmaktadır (25,26). Yaşa bağlı olarak ROS üretiminde ortaya çıkan artış ve/veya süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan ezim aktivitelerindeki azalmaların besin kısıtlamasıyla kısmen önlendiği ve böylece lipit, protein ve DNA gibi hücrel makromoleküllerin oksidatif strese korunduğu, mtDNA'da daha az mutasyon birikimi olduğu ileri sürülmektedir (28,29,30).

Son yıllarda önce drozofilalarda daha sonrada böcekler ve kemirgenlerde yapılan çalışmalarla, alınan besin miktarının kısıtlanması yerine, spesifik besin öğelerinin kısıtlanmasının da yaşam süresinin uzatılmasında etkili olabileceği görüşünün ortaya atılmasına yol açmıştır (28,31,32). Bu amaçla yapılan çalışmalarda, karbonhidrat kısıtlamasının yaşam süresini uzatıcı etkisinin çok az olduğu ya da aksine kısalttığı, lipit kısıtlamasının etkili olmadığı görülmüştür (33-36). Protein kısıtlamasının ise çeşitli hayvan türlerinde mitokondriyal ROS oluşumu, protein oksidasyon ürünleri ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerini, kalori kısıtlamasına benzer şekilde azalttığı ve yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (28). Protein kısıtlamasının maksimum yaşam süresini uzatıcı etkileri yanı sıra preneoplastik lezyon ve tümör oluşumunu

azaltıcı etkilere de sahip olduğu gösterilmiştir (37). Elde edilen bulgular, protein kısıtlamasının sağladığı etkilerden sorumlu olabilecek aminoasitlerin belirlenmesine yönelik çalışmaları başlatmıştır. Bu çalışmalarda en dikkat çekici sonuçlar metyonin kısıtlamasıyla sağlanmıştır. Metyonin kısıtlamasının sıçan ve farelerin yaşam süresini uzattığı, yaşlanma ile ortaya çıkan birçok değişikliği geciktirdiği saptanmıştır (38-40). Metyonini %40 ve %80 kısıtlanmış yemle beslenen Wistar sıçanların karaciğerinde oksidatif mtDNA, protein ve lipid hasarı ve serbest radikal kaçışının anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (41).

Telomerler, ökaryotik kromozomların uçlarında bulunan özelleşmiş, tekrarlayan DNA dizileridir. Kromozomların son kısımlarını rekombinasyon, yıkım ve füzyon gibi zararlı durumlardan koruyarak kromozomların bütünlüğünü ve stabilitesini sağlarlar (16,42,43). Replikasyon sırasında lineer kromozomal DNA molekülünün son kısmının tamamlanmasında görev alırlar (42). Telomerlerin sentezi ribonükleoprotein yapısında bir reverstranskriptaz olan telomeraz enzimi tarafından gerçekleştirilir (16). Telomeraz, kendi RNA'sını kalıp olarak kullanarak sentezlediği heksomerik parçaları (TTAGGG)_n kromozomların uçlarına ekleyerek kromozom uçlarındaki kaybı dengeler (16). Yapılan çalışmalar, insan fibroblastlarının ortalama 50 hücre bölünmesinden sonra gelişme ve bölünme yeteneklerini yitirerek yaşlandığını, yaşlanmış hücrelerin metabolik olarak aktif kaldığını ancak daha fazla yeni hücreler meydana getiremeyerek en sonunda öldüğünü göstermiştir (5). Fibroblast kültüründe gerçekleştirilen çalışmalarla telomer uzunluğunun dış etkenler tarafından özellikle de, oksidatif stres tarafından belirlendiği saptanmıştır (44,45,46). Oksidatif stresin telomerlerde, telomerik olmayan kromozomal DNA'ya göre daha fazla hasar oluşturduğu ve telomeraz aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (46).

Çeşitli deney hayvanları ve insanlarda, protein veya metyonin kısıtlamasının oksidatif stres ve yaşlanmadaki rolünü ya da oksidatif stres ve yaşlanma ile telomer uzunluğu/telomeraz aktivitesi arasındaki ilişkiyi inceleyen çok sayıda araştırma mevcuttur. Ancak, yaşlanma sürecinde protein kısıtlamasının oksidatif stres, telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesine etkilerini bir arada inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, metyonin hariç proteini %40 azaltılmış yemle (PKY) beslenmenin yaşlanma sürecindeki sıçanların karaciğer homojenatında ve mitokondri fraksiyonunda süperoksit ve peroksit salınımı, protein karbonil düzeyleri, genomik ve mitokondriyal DNA'da 8-OHdG düzeyleri ile telomeraz aktivitesi ve telomer uzunluğuna etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. YAŞLANMA

Yaşlanma tüm canlılarda yaş ilerledikçe molekül, hücre, doku, organ ve organ sistemleri düzeyinde ortaya çıkan, çok faktörlü ve geri dönüşümsüz evrensel bir süreçtir. Canlı organizmanın hayata başladığı andan itibaren gelişme, kendini yenileme, hareket, üreme, metabolizma gibi hayati fonksiyonlarında gerileme ve fonksiyon kaybıyla kendini belli eder ve ölümlü sonlanır. Yaşlanmanın kendini belli etme ve ilerleme hızının farklı türlerde, aynı türdeki farklı canlılarda, bir organizmanın dokularında, dokudaki hücre tiplerinde ve hücredeki makromoleküller de oldukça değişkenlik gösterdiği saptanmıştır (9,15). Biyolojik yaşlanma hızını ve şeklini belirleyen temel faktörlerin genetik yapı, yaşam stili ve çevre koşulları ile bu koşullara verilen biyokimyasal, metabolik ve immünolojik yanıtlar olduğu bildirilmiştir (1,9).

Yaşlanma bakterilerden insanlara tüm canlıları etkilediğinden, biyolojiyle ilgilenen tüm bilim dallarının en eski ve güncelliğini hiç yitirmeyen araştırma konusunu oluşturmaktadır. Bir canlının yaşam süresi ait olduğu tür için karakteristiktir ve türler arasında yaşam süresi açısından önemli farklılıklar bulunmaktadır (47,48). Doğada bazı türlerin ortalama yaşam süresi birkaç saatle sınırlıyken Galapagos kaplumbağalarında olduğu gibi 200 yıl yaşayabilen canlılar da mevcuttur. Yazılı tarihin başlangıcında savaşlar, kıtlıklar, bulaşıcı hastalıklar, tanı, tedavi ve bakım yetersizliği nedeniyle insanların ortalama yaşam süresi oldukça kısaydı. Yapılan araştırmalar Antik Roma'da ortalama yaşam süresinin 22 yıl olduğunu, bilimin etkisinin hissedilmeye başladığı 1800'lü yıllarda ise bu sürenin 41-42 yıla kadar yükseldiğini ortaya koymuştur (49). Moleküler biyoloji alanında elde edilen gelişmeler, genetik yapının hastalıklarla ilişkisinin, hastalıkların patofizyolojisinin ve hastalık etkenlerinin daha iyi anlaşılmasına, daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Günümüzde kronik hastalıklar, kanser ve bulaşıcı hastalıklar gibi başlıca ölüm nedeni olan durumlarla daha etkin bir şekilde mücadele edilebilmektedir. Bu durum Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerinde ortalama yaşam süresinde beklenen artışın sağlanmasıyla da doğrulanmıştır (49,50). İstatistik veriler ortalama yaşam süresinin İsveç ve İsviçre'de 80, Japonya'da 81, Fransa, Avustralya, İtalya, Kanada ve Norveç'te ise 79 yıl olduğunu göstermektedir. Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) verilerine göre 1960 yılında ülkemizde 65 yaş ve üzerindeki kişilerin genel nüfusa oranı

%3.53'tür. 2008 yılında ise erkeklerin %19'unun, kadınların %37'sinin 85 yaşın olduğu ve beklenen yaşam süresinin erkekler için 71.6, kadınlar için 76.3'e ulaştığı bildirilmiştir (51).

Canlı türlerinin ortalama yaşam süreleri arasındaki farklar birçok türde ölüm zamanındaki ortalama, medyan veya modal yaşın saptanması gibi ölçümlerle ortaya konmuştur (47). Bazı türlerde yaşam süresinin nispeten dar bir yaş aralığında yığılırken diğer bazı türlerde bu aralığın çok geniş olduğu görülmüştür (48). Yapılan çalışmalar, bu durumun metabolik hız ve oksidan bileşiklerle ilişkili olduğunu ve metabolik hız ile yaşam süresi arasında ters bir ilişki bulunduğunu göstermiştir. *M. musculus* ve *P. leucopus* türü farelerden izole edilen mitokondrilerde, süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumu ölçüldüğünde, *P. leucopus* farelerin yarısı kadar ömre sahip olan *M. musculus* farelerin %48–74 daha fazla süperoksit ve %300–500 daha fazla hidrojen peroksit oluşturduğu saptanmıştır (48,52). Yaşam süreleri arasında iki kat fark olan beş sinek türünün karşılaştırması da, yaşam süresi ile mitokondriyal süperoksit ve hidrojen peroksit üretimi arasında negatif bir ilişki olduğu göstermiştir (52).

Ortalama yaşam süresi, canlı türleri arasında farklı olduğu gibi cinsiyetler arasında da farklılık göstermektedir. Birleşmiş Milletlerin dünya ülkelerinde 2000–2015 yılları için yaptığı bir çalışmada gelişmiş batı ülkelerinde ortalama yaşam süresi beklentisi erkekler için 77 yıl, kadınlar için 83 yıl olarak saptanmıştır (53). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) tarafından 2000–2015 yılları için yapılan bir çalışmaya göre de ülkemizde 2015 yılında ortalama yaşam süresinin kadınlar için 75.2 yıl, erkekler için 70.3 yıl olacağı öngörülmüştür (51). Yüzyıldan fazla yaşayan kadınların sayısı, erkeklerin sayısının beş katıdır (54). Ortalama yaşam sürelerinde gözlemlenen cinsiyetler arası farklılık yalnızca insanlara özgü değildir. Yapılan birçok hayvan çalışmasında, kemirgenlerde, toynaklı hayvanlarda, keseli hayvanlarda ve şempanze gibi primatlarda da dişilerin ortalama yaşam sürelerinin erkeklerden daha fazla olduğu gösterilmiştir (55,56).

2.1.1. Yaşlanma Teorileri

Yaşlanmayı etkileyen faktörleri belirlemek amacıyla çok sayıda klinik ve laboratuvar çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda yaşlanmanın tek bir faktöre bağlı olmadığı, kalıtsal ve çevresel faktörlerle yaşam tarzının bir bileşkesi olarak gerçekleştiği

kabul edilmektedir. Yaşlanmada, özelliklede insan yaşlanmasında genetik yapı başta olmak üzere beslenme ve egzersiz alışkanlığı, sigara, alkol kullanımı gibi yaşam stili ile ilgili etkenler, stres, serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar gibi bazı moleküllerin organizmadaki düzeyi, hipertansiyon ve diyabet gibi kronik hastalıkların varlığı dahil birçok faktörün etkili olduğu bildirilmiştir (1,57). Bu faktörlerin yaşlanmadaki rolünü açıklayan moleküler mekanizmalar ve yaşlanmanın neden(ler)i henüz tam olarak bilinmemektedir. Canlıların neden yaşlandığını açıklamaya yönelik 300'den fazla teori ileri sürülmüştür (57). Bu teorilerden *Hücre Yaşlanması* ve *Telomer Kısalması Teorisi*nde olduğu gibi bazılarında organizmada zamanla meydana gelen değişikliklerin canlının genetik yapısıyla ilişkili olduğu, yaşlanmaya başlama zamanı, yaşlanma hızı ve yaşam süresinin DNA'daki genetik kodla belirlendiği öne sürülmektedir (5,9,57). *Somatik Mutasyon Teorisi* ve *Yaşlanmada Serbest Radikal Teorisi* gibi diğer teorilerde ise yaşlanmanın geçen zamana paralel olarak organizmada biriken hasarın bir sonucu olduğu ileri sürülmektedir (2,3,57). Bu hasar, aerobik yaşam ve/veya beslenme alışkanlığı sonucu oluşabileceği gibi, organizmanın doğal yaşam sürecinde görev alan çeşitli biyolojik mekanizmaların ürettiği ve hücrede fonksiyon bozukluğuna yol açan toksik metabolitler tarafından da oluşturulabilmektedir (9,57).

Yaşlanmanın mekanizmasını açıklamaya yönelik teoriler arasında en dikkat çekici olan ve günümüzde geçerliliği tartışılmaya devam eden teoriler aşağıda kısaca özetlenmiştir.

■ Somatik Mutasyon Teorisi

Hücre DNA'sının toksik metabolitler, radikaller, iyonize radyasyon, UV ışını, toksinler, ilaçlar gibi birçok endojen ve eksojen etken tarafından sürekli olarak hasara uğratıldığı (mutasyon) ve oluşan hasarın tamir mekanizmaları tarafından hızla ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (23). Yaş ilerledikçe, DNA tamir mekanizmalarının yavaşladığı ve oluşan hasarı tamir etmekte yetersiz kalmaya başladığı ileri sürülmektedir. Buna bağlı olarak, ortaya çıkan hasar giderek kalıcı bir hal almakta, sonunda da hücrelerin, dokuların ve organların yapı ve fonksiyonlarını bozarak yaşlanmaya neden olmaktadır. Yaş ilerledikçe artan kanser riskinin DNA mutasyonlarındaki kümülatif artış ve immün sistem fonksiyonlarındaki azalma ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (58). *DNA Hasarı Teorisi* olarak da adlandırılan ve 1952'de Medavar (2) tarafından ortaya atılan

Somatik Mutasyon Teorisine göre yaşlanmadan oksidasyon, radyasyon veya toksinler gibi etkenlerin oluşturduğu çeşitli mutasyonlarla, DNA hasarının tamirinden sorumlu mekanizmalar arasındaki dengenin DNA hasarı lehine bozulması sorumludur (59-61). Bu teori, yaş ilerledikçe mutasyonlarda artış ve oluşan hasarın giderek kalıcı olması bulguları ile desteklenirken, yıllarca düzenli bir şekilde çalışan DNA tamir mekanizmalarında ortaya çıkan yetersizliğin nedenlerini ve mekanizmasını tam olarak açıklayamamaktadır.

■ Nöro-Endokrin Teori

İlk kez 1960'lı yıllarda Vladimir Dilman (6) tarafından ortaya atılan *Nöro-endokrin Teori*, yaşlanmanın sadece nöronlar ve nöronlarla ilgili hormonal mekanizmaların fonksiyonlarındaki azalmaya bağlı olarak geliştiğini savunmaktadır. Bu teori yaşlanmaya, geçen zamanla birlikte santral sinir sisteminin (hipotalamus) düzenleme yeteneğindeki azalma ve periferik reseptörlerde ortaya çıkan hassasiyet kaybının neden olduğunu ileri sürmektedir. Hipotalamustaki bu fonksiyon kaybının, vücudun iç dengesini sağlayan homeostaz mekanizmalarında ilerleyici bir sapmaya ve hormonların, nörotransmitterlerin, sinyal moleküllerinin düzeylerinde değişikliklere yol açtığına tüm bunlarında sonuçta yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı ortaya çıkan hastalıklara neden olduğuna inanılmaktadır. Bu teori üzerinde çalışan bazı araştırmacılar bir epifiz hormonu olan melatoninin yaşlanmada rol aldığını öne sürerken, diğerleri böbrek üstü bezinden salgılanan dihidroepiandrosterondaki (DHEA) azalmanın yaşlanmada etkili olduğunu öne sürmektedir. DHEA düzeyinin genç insanlarda daha yüksek olması ve hayvanlara DHEA takviyesi yapılmasının yaşam süresini uzatması bu teoriyi desteklemekle birlikte, yaşlanma sürecini tam olarak açıklayamamaktadır. Nöro-endokrin teorinin en önemli özelliği, kabul görmüş diğer yaşlanma teorileriyle çatışmamasının yanı sıra, onlardan farklı olarak, özgün bir yaklaşım getirmesidir. Başka bir ifadeyle bu teori diğer teorileri ya desteklemekte, ya da onların kapsamı içinde yer almaktadır. (62-64)

■ Yaşlanmada Serbest Radikal Teorisi

Yaşlanma konusunda ortaya atılan teoriler arasında en fazla kabul gören ve incelenenlerden birisi olan *Yaşlanmada Serbest Radikal Teorisi*, 1956 yılında Harman (3) tarafından ortaya atılmıştır. Harman yaşla birlikte hücre ve dokularda biriken çeşitli

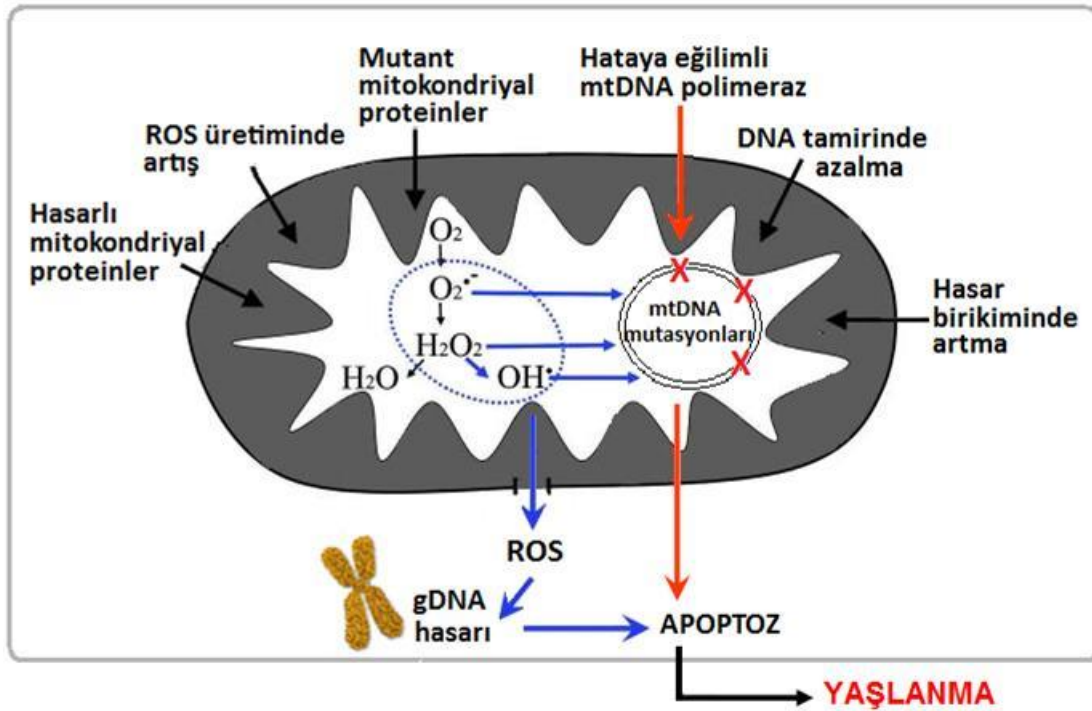
değişikliklerin hastalık ve ölüm riskini arttırdığını vurgularken, yaşlanma sürecinin iki önemli karakteristiği olan biyolojik fonksiyonlar ve strese dirençteki azalma ile hastalık eğilimdeki artışa dikkat çekmiştir. Bu teori, bütün canlıların yaşlanma ve ölümünden genetik ve çevre faktörleri tarafından düzenlenen ortak tek bir sürecin sorumlu olduğunu ileri sürmektedir. Buna göre yaşlanma ve ona bağlı olarak ortaya çıkan dejeneratif hastalıklar, serbest radikallerin hücre bileşenleri ve bağ dokusuna yaptığı saldırıların bir sonucudur. Serbest radikaller muhtemelen hücre içinde moleküler oksijenin de rol aldığı bazı reaksiyonlar ve bağ dokusundaki demir, kobalt ve mangan gibi geçiş metal iyonları tarafından oluşturulmakta ve hücre membranını, proteinlerini, lipitlerini ve DNA'sını hasara uğratmaktadır. Vücutta metabolizma sırasında açığa çıkan serbest radikallerin yanı sıra sigara içimi, çevre kirliliği, iyonize radyasyon, UV ışınları gibi zararlı dış etkenler de radikal oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan bu radikaller *oksidatif hücre hasarı* olarak nitelendirilen zararlı etkileri meydana getirmektedir (10-14). Canlılar serbest radikaller ve bunların yol açtığı oksidatif hasardan korunmak için antioksidan savunma sistemleri geliştirmiştir. Bu sistemler sürekli olarak vücudu radikallerin zararlı etkilerinden korumaya çalışmaktadır. Yaşlanmada serbest radikal teorisine göre, yaş ilerledikçe oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki denge oksidanlar lehine değişmektedir. Bunun sonucu olarak, başta DNA olmak üzere hücre bileşenlerinde meydana gelen kalıcı hasar hücrelerin büyüme, gelişme ve farklılaşma fonksiyonlarında bozulma, kanser, ateroskleroz gibi hastalıklar ve nihayet ölüme neden olmaktadır.

Kısa yaşam süreli canlıların oksidatif stres ve oksidatif hasara karşı uzun yaşam süreliyelerden çok daha duyarlı olması, kümülatif oksidatif hasarın yaşla birlikte artması, yaşla ilintili dejeneratif hastalıklarda (Alzheimer, ateroskleroz, Parkinson, diyabet vb) ve doku atrofisinin ön planda olduğu fenotiplerde serbest radikallerin daha yüksek düzeyde bulunması bu teorinin başlıca desteklerini oluşturmaktadır.

■ Yaşlanmada Mitokondriyal Teori

İlerleyen yıllarda *Yaşlanmada Serbest Radikal Teorisini* destekleyen çok sayıda bulguya ulaşılması ve çalışmaların çoğunun bu teoriyi onaylanması üzerine, Harman (4) 1972 yılında mitokondriyi merkez alan *Yaşlanmada Mitokondriyal Teori* ortaya atmıştır. Yayınlanan çalışmasında, “solunum zincirinden kaçan serbest radikallerin zararlı etkilerini genellikle mitokondri üzerinde göstermeleri beklenir, bu moleküllerin

davranışını belirleyen nedir, bu davranışlardan mtDNA sorumlu olabilir mi?” sorularına yanıt aramıştır. Bu soruların yanıtları, mitokondriyal teorinin temel felsefesini oluşturmuş ve Harman’ın öne sürdüğü mitokondriyal yaşlanma teorisi o tarihten itibaren birçok çalışmaya konu olmuştur (21,22,65,66). Mitokondriyal teori, normal koşullarda devamlı üretilmekte olan ROS’un miktarının yaş ilerledikçe arttığını, bu artışın da elektron transport zinciri fonksiyonlarında bozulma, mtDNA’da delesyon ve mutasyonlara neden olduğunu ileri sürmektedir. Mitokondrideki antioksidan savunma sistemleri mitokondriyi bu zararlı etkilerden korumaya çalışsa da yaş ilerledikçe oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki denge, oksidanlar lehine değişmektedir. Bir bütün olarak ele alındığında yaşlanmaya neden bu süreç, bir süre sonra kısır döngü halini alır ve hücre ölümüyle sonuçlanır (Şekil 2-1), (7,8). Oksidatif mtDNA hasarı ve bu hasara bağlı mutasyonların yaşlanma sürecinde önemli olduğu ve mitokondrinin yaşlanmada anahtar rol oynadığı Miquel ve ark.’larının (21,67) çalışmalarıyla da desteklenmiştir.



Şekil 2-1: Mitokondriyal Yaşlanma Teorisi

■ Hücre Yaşlanması ve Telomer Kısılması Teorisi

Bilindiği gibi telomerler, ökaryotik canlılarda kromozomların uç kısımlarında bulunan özelleşmiş, DNA tekrar dizileridir. *Hücre Yaşlanması ve Telomer Kısılması Teorisi*, her replikasyon sonunda telomerlerin uzunluğunda meydana gelen azalmanın yaşlanmaya neden olduğu temeli üzerine kurulmuştur. Replikatif yaşlanma ve bunun hücre yaşlanmasıyla ilişkisini, insan fibroblast kültürü ile çalışan Hayflick ve Moorhead (5) tanımlamıştır. Normal hücrelerin hücre kültüründe, belli bir bölünme sayısına ulaşıldıktan sonra daha fazla çoğalmadığı gözlemlenmiş ve bu durum *replikatif yaşlanma* olarak adlandırılmıştır. Hücre yaşlanmasının moleküler mekanizmasında, hücre siklusunun düzenlenmesinde görevli tümör supresör proteinler olan p53 ve Rb anahtar rol oynar. Hücre yaşlanma sürecine girdiğinde p53 ve Rb aktif durumdadır, bu proteinlerin inaktive olması hücrenin yaşlanma sürecine girmesini önler, hücre çoğalmaya devam eder (68). Primer hücre kültürlerinde telomer boyunun kısılması replikatif yaşlanmaya öncülük eder. Hücrede meydana gelebilecek genetik değişiklikler hücreyi; a) Ölüme götürür: p53 veya Rb proteini inhibe olduğunda hücre bölünmeye devam eder ancak, bir süre sonra *telomer krizine* girer. Telomer krizi de replikatif yaşlanmayı başlatır, kromozomların yapısı bozulur ve hücre ölümü gerçekleşir. Replikatif yaşlanma ya da telomer krizi, telomeraz ekspresyonu ile atlatılabilir ancak bu da hücreye ölümsüzlük kazandırır, yani kanser hücresine dönüşmesine neden olabilir. b) Hücresel değişime yol açar: p53 kaybı nedeniyle hücre büyüklüğü kontrol edilemez, telomer fonksiyonları bozulur ve hücre mikro düzeyde bir kaosa sürüklenir. Genetik kaos, insanda birçok kanser çeşidinin gelişimindeki en önemli adımdır (5,68,69).

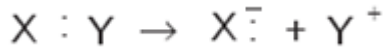
2.2. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektrona sahip, kararsız bir yapı sergileyen bileşiklerdir. Oldukça reaktif ve kısa ömürlü olan bu bileşikler, yapılarındaki eksik elektronu tamamlayarak kararlı bir hale dönüşmek için çevrelerindeki moleküllerle kolaylıkla elektron alışverişi yapabilir veya onlarla birleşebilirler (70). Elektron alışverişi sonucunda, elektron kaybeden moleküllerin yapı ve fonksiyonunu değiştirerek hücre hasarına kadar gidebilen değişikliklere yol açarlar (71-73). Serbest radikaller başlıca üç mekanizma ile oluşmaktadır (70,72).

a- Kovalent bağların homolitik kırılması: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklıkla kimyasal bağların kırılması sonucu, bağ yapısına katılan elektronların her birinin ayrı atomlar üzerinde kalmasına bağlı olarak iki adet yüksek reaktiviteli serbest radikal oluşur.



b- Bir molekülün elektron kaybetmesi: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülün elektron kaybı sırasında, dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalması halinde o molekül radikale dönüşür. Askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller gibi antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip onları indirgerken, kendilerinin radikale dönüşmesi bu tip radikal oluşumunun en bilinen örnekleridir.



c- Bir moleküle elektron transferi: Radikal özelliği taşımayan bir molekül, tek elektron transferi ile radikale dönüşür. Bu tip reaksiyonların en bilinen örneği ETZ'de moleküler oksijenin tek elektronla indirgenerek süperoksit radikaline dönüşmesidir.



Serbest radikaller, organizmanın normal metabolizma faaliyetleri sırasında üretildikleri gibi dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilmektedir. Endojen serbest radikallerin başlıca kaynağı mitokondrilerdir (4,65,66,67). Ayrıca NADPH oksidaz, sitokrom P₄₅₀, siklooksijenaz ve monoamin oksidazın katalizlediği reaksiyonlar dahil çeşitli reaksiyonlar sonucunda da serbest radikaller oluşmaktadır (65). Serbest radikal oluşumuna yol açan dış etkenler arasında stres, pestisidler ve karbon tetraklorür kimyasallara maruziyet, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize radyasyon ve ultraviyole ışınları, hava kirliliği, sigara içimi, demir, bakır, kadmiyum gibi metal iyonları gibi çevresel faktörler başta olmak üzere birçok etken bulunmaktadır. (72-74).

Tablo 2-1: Biyolojik sistemlerde sık karşılaşılan serbest radikaller

REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ			
<i>Radikal</i>		<i>Radikal Olmayan</i>	
Süperoksit	$O_2^{\bullet-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	OH^{\bullet}	Oksijen	O_2
Alkoksil	RO^{\bullet}	Ozon	O_3
Peroksil	ROO^{\bullet}	Hipoklorid asit	$HOCl$
Hidroperoksil	H_2O^{\bullet}	Lipit peroksit	$LOOH$
REAKTİF NİTROJEN TÜRLERİ			
Nitrik oksit	NO^{\bullet}	Nitröz asit	HNO_2
		Nitrozil katyonu	NO^+
		Nitrozil anyonu	NO^-
Azot dioksit	NO_2	Alkik peroksinitrit	$ROONO$
Peroksinitrit	$ONOO^-$	Nitronyum katyonu	NO_2^+

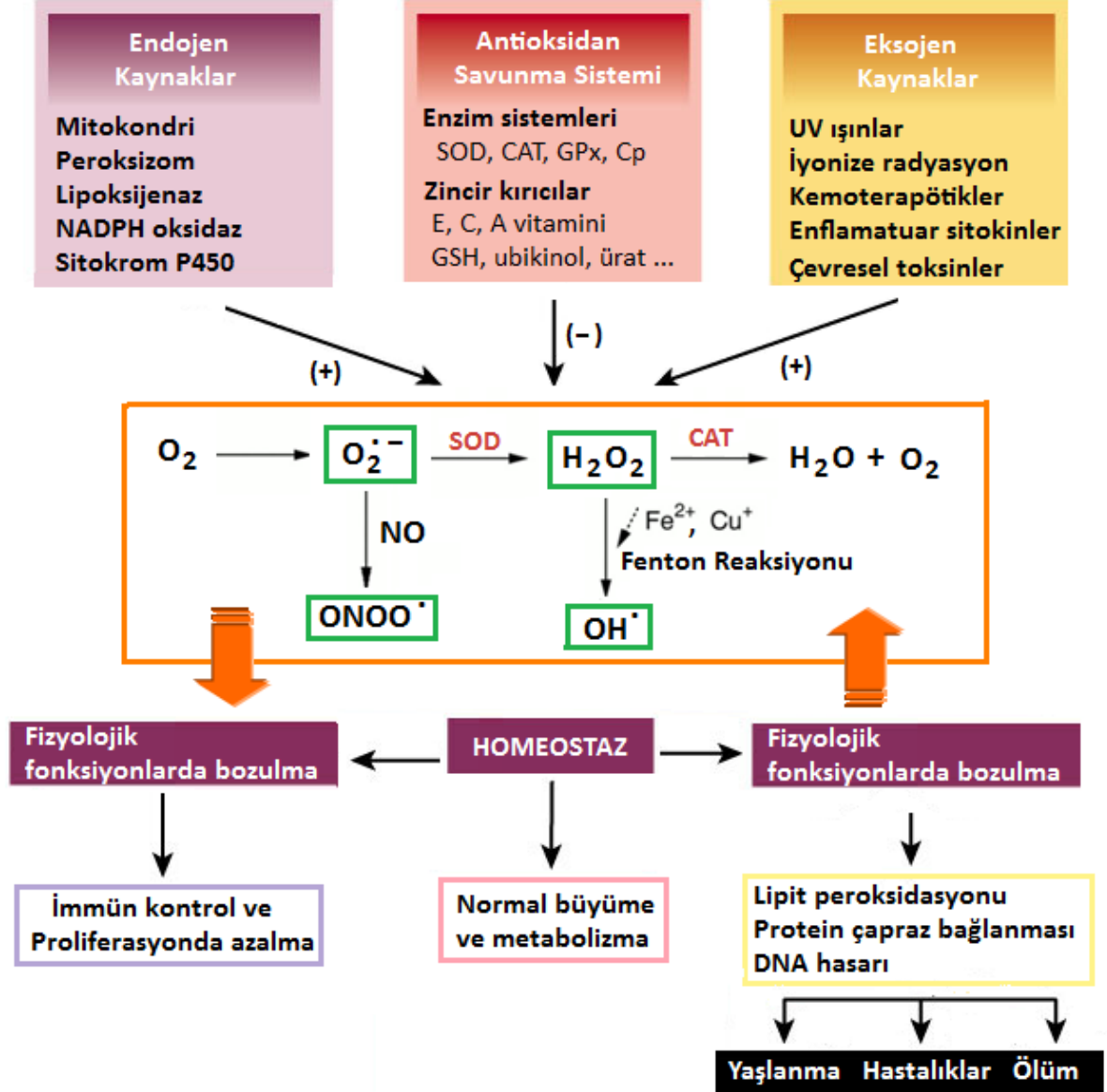
Biyolojik sistemlerde en bol bulunan ve biyolojik öneme sahip serbest radikaller, azot ve oksijenden türeyenlerdir. Serbest oksijen radikali oluşumunda anahtar rolü oynayan birleşik oksijenin kendisi başta olmak üzere süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metalleri ve hidroksil radikali (OH^{\bullet})'dir (71). İki tane eşleşmemiş elektronu bulunduğundan moleküler oksijenin (O_2) kendisi de bir radikaldir. Her iki atom denge halinde olduğundan bu molekül reaktif değildir ancak, diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilir. Bilindiği gibi, aerobik organizmalarda enerji üretimi sırasında oksijen mitokondriyal elektron transport zinciri tarafından gerçekleştirilen bir seri reaksiyonla suya indirgenir. Mitokondride gerçekleşen bu işlem sırasında tüketilen oksijenin %1–5 kadarı süperoksit radikali oluşumuyla sonlanır. Bu süreçte radikal oluşumunun nedeni, ETZ'de oluşan bir kaçak sonucu elektronların kompleks I veya III aşamasındayken oksijene aktarılmasıdır. Aerobik canlıların metabolizması sırasında oluşan farklı türdeki pek çok serbest radikal arasından nitrik oksit (NO), süperoksit ve hidroksil radikali ile hidrojen peroksit özel bir öneme sahiptir (Tablo 2–1). Biyolojik sistemlerde en bol üretilen radikaller olan süperoksit radikali ve nitrik oksit, hidroksil

radikali ve peroksinitrit gibi son derece zararlı radikallerin oluşumunu başlatma yeteneğine sahiptir. İlk oluşan oksijen radikali olmanın yanı sıra, süperoksit radikalının diğer önemli bir özelliği de geçiş metal iyonlarını indirgeyebilmesi ve hidrojen peroksit kaynağı olmasıdır. Kuvvetli bir indirgen olan süperoksit radikali aerobik canlılarda süperoksit dismutaz enzimi (SOD) tarafından hızla hidrojen peroksite dönüştürülür. Hidrojen peroksit, yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden bir radikal değildir ancak, radikal oluşturma potansiyeli yüksek bir birleşiktir. Demir, bakır gibi geçiş metal iyonlarının varlığında, en reaktif radikal olan hidroksil radikalının oluşumuna neden olur (Şekil 2-2). Bu durumda, hidrojen peroksinin katalaz ve glutatyon peroksidaz (Gpx) enzimleri tarafından ortamdaki hızla uzaklaştırılması önemlidir (72-74).

Serbest radikaller organizmada belirli düzeylerde bulunur, hücre-aracılı immunité ve sinyal iletimi gibi bazı fizyolojik fonksiyonların gerçekleşmesi için gereklidir. Hücrede bu bileşiklerin fizyolojik fonksiyonlar için gerekenden daha yüksek düzeylere ulaşması, hücre için tehlikelidir. Serbest radikaller çevredeki makromoleküllerden bir elektron alarak kararlı bir yapıya kavuşurken, elektron aldıkları molekülü radikale dönüştürürler. Tek bir radikalle başlatılan reaksiyon katlanarak yayılma eğilimindedir, ortamda uygun bileşiklerin varlığında zincirleme olarak devam eder. Serbest radikallerin moleküler düzeyde sergiledikleri bu yıkıcı etkiler sonuçta organ hasarına kadar giden oksidatif değişikliklere yol açmaktadır (75). Başlamış bir serbest radikal reaksiyonu radikallerin antioksidanlarla indirgenmesi, radikallerin birbirleri ile reaksiyona girmesi ya da ortamda reaksiyona girebilecek bileşik kalmaması durumunda sona erer.

Organizma, yaşamı boyunca sürekli olarak maruz kaldığı serbest radikal saldırısından antioksidan sistem sayesinde korunmaktadır. Antioksidanlar etkilerini lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak, hidroksil radikallerini uzaklaştırıp zincir reaksiyonun başlamasını önleyerek, geçiş metal iyonlarını bağlayıp etkisizleştirerek veya peroksitlerin alkol gibi radikal olmayan ürünlere dönüşümünü sağlayarak gösterirler (76,77). Antioksidan savunma sisteminin başlıca elemanları Şekil 2-2'de görülmektedir. Antioksidan savunma sistemleri fizyolojik koşullarda serbest radikal oluşumu ile bir denge halindedir ve organizmayı serbest radikal hasarından korumaya çalışmaktadır. Vücutta serbest radikal oluşumunun artması ya da antioksidan sistemlerdeki bir azalma, dengenin oksidatif lehine bozulmasına ve oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres ve bunun yol açtığı oksidatif hasarın enflamasyon, yaşlanma,

ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik hasar, karsinojeniz, mutajenez yanı sıra, otoimmün ve dejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde ve/veya ilerlemesinde rol aldığı birçok çalışmayla gösterilmiştir (8,73).



Şekil 2-2: Elektron transport zincirinde serbest oksijen radikalleri oluşumu ve etkileri

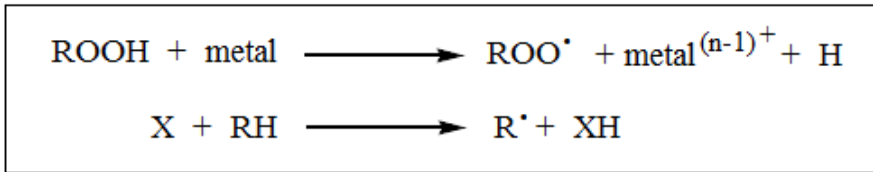
2.2.1. Serbest Radikallerin Hücresel Makromoleküllere Etkileri

A- Lipitlere Etkileri

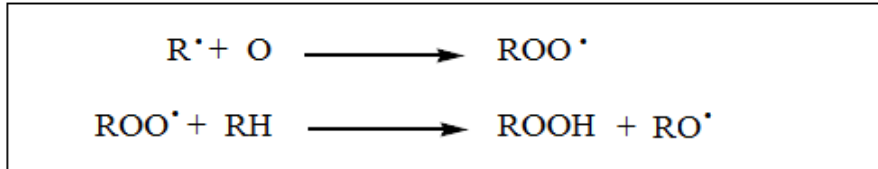
Serbest radikallerin lipitler üzerindeki en önemli etkisi lipit peroksidasyonunun uyarılmasıdır (Şekil 2-3). Zincirleme olarak gerçekleşen ve geri dönüşümsüz olan bu

reaksiyon, doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomunun çıkmasıyla başlar ve yağ asidinin lipit radikaline dönüşmesine neden olur. Oldukça dayanıksız olan bu lipit radikali, çift bağların yerinin yeniden düzenlenmesi ve oksijenle reaksiyon sonucu lipit peroksil radikaline dönüşür. Lipit peroksil radikali de bir taraftan çevresindeki doymamış yağ asitlerine etki ederek yeni radikallerin oluşumuna yol açarken diğer taraftan aldığı hidrojen atomlarıyla hidroperoksitlere dönüşür. Bu şekilde zincirleme olarak devam eden lipit peroksidasyonu ya antioksidanlar tarafından sonlandırılır ya da membran yapısının bozulmasına yol açan malondialdehit oluşumuna kadar devam eder. Lipit peroksidasyonu, hücre membranının başta taşıma fonksiyonu olmak üzere birçok fonksiyonunu kaybetmesine neden olur. Bu olumsuz etkiler hücre içinde proteazların aktiflenmesi ve kalsiyum konsantrasyonu artışına yol açarak hücreyi ölüme götürürken lipit peroksidasyonu ürünleri membran proteinlerini de hasara uğratarak yapısal ve fonksiyonel bozuklukları hızlandırır (71-73,78,79).

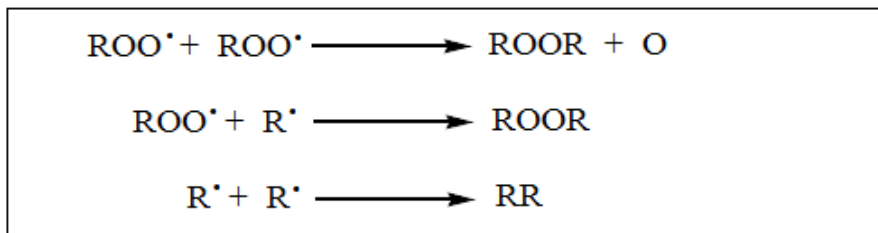
1- BAŞLAMA



2- İLERLEME



3- SONLANMA



Şekil 2-3: Hücre içi lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonları

B- Proteinlere Etkileri

Serbest radikallerin proteinler üzerindeki zararlı etkileri yapılarındaki bağların özelliği ve amino asit içerikleri ile ilişkilidir. Yapısında tirozin, fenil alanin, histidin gibi çift bağ bulunan ya da metyonin, sistein gibi sülfür içeren amino asitlere sahip proteinler serbest

radikallerden daha kolay etkilenir. Serbest radikallerin proteinlerde, molekül içi veya moleküller arası çapraz bağların oluşumu, sülfidril gruplarının oksidasyonu, disülfidlerin indirgenmesi, metallerle katalizlenen reaksiyonlar aracılığıyla metal bağlanma bölgelerine yakın amino asit kalıntılarının kaybı ve parçalanmaya yol açtığı gösterilmiştir (80,81). Tüm bu etkiler proteinlerin kataliz, transport, sinyal iletimi gibi fonksiyonlarını bozmanın yanı sıra, immun sistemi uyaran antijenik değişikliklere de neden olabilmektedir. Serbest radikallerin yol açtığı hasar, proteinlerde birikerek veya proteinlerin belirli bölgesine yoğunlaşarak hücrenin canlılığını tehdit eder hale gelebilir. Serbest radikaller proteinlerde birçok değişikliğe yol açtığından, oksidatif protein hasarının belirlenmesi güçtür. Bu amaçla en sık kullanılan parametrelerden birisi, peptid bağlarının yıkılmasıyla serbestleşen karbonil gruplarının tayinidir (80-82).

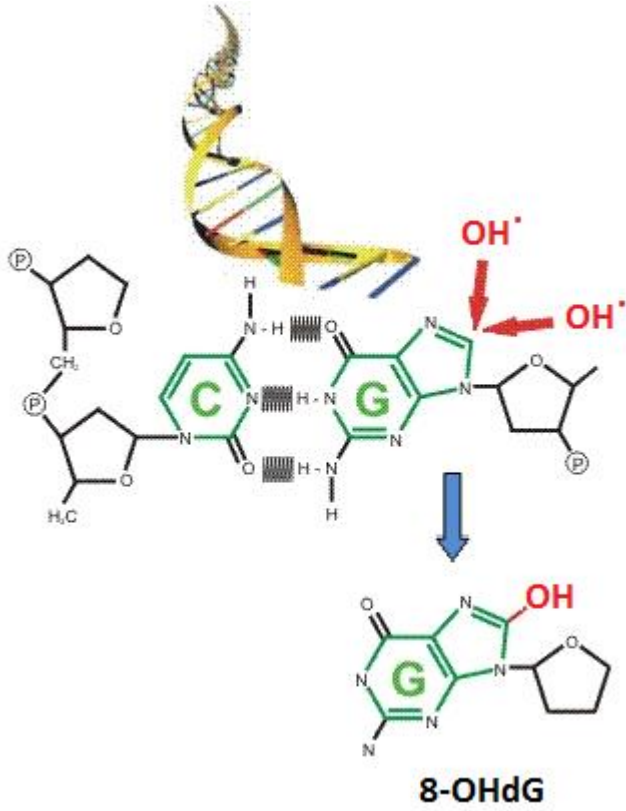
C- Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

DNA, yaşam boyunca ROS tarafından sürekli olarak değişime uğratılır. Endojen veya ekzojen kaynaklı ROS etkisiyle hücre DNA'sının moleküler bütünlüğünde meydana gelen tüm değişiklikler oksidatif DNA hasarı olarak adlandırılır. Bu değişimlerin etkin olarak tamir edilemeyip birikmesinin, prokaryotlarda hücre ölümünden, ökaryotlarda başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklar ve yaşlanmadan sorumlu olduğu kabul edilmektedir (15,83). Ökaryotik bir hücrede hem genomik DNA (gDNA) hem de mtDNA ROS için hedefdir. mtDNA'da oluşan oksidatif hasarın gDNA'dakine göre daha fazla olduğu ve birikme eğiliminin de yüksek bildirilmiştir (84). mtDNA, ne gDNA gibi kompleks bir yapılanma ve histonlara, ne de ROS ataklarından korunmak için yeterli antioksidan savunma mekanizmalarına sahiptir. Aksine, mitokondri içinde serbest radikal oluşturan bölgelerin çok yakınında bulunur, hasar tamir mekanizmaları da yetersizdir.

Oksidatif DNA hasarının oluşumu ile ilgili iki hipotez ileri sürülmektedir. Bunlardan *Fenton kimyası hipotezine* göre, süperoksit ve hidrojen peroksit DNA'da doğrudan bir hasar oluşturmaz, DNA hasarının sorumlusu hidroksil radikalleridir. Hidroksil radikalının DNA ile reaksiyonlaşabilmesi için DNA'nın çok yakınında oluşması gerekmektedir. Ancak reaktivitesi çok yüksek olsa da, hücre içinde hidroksil radikalının nükleusa ulaşma olasılığı oldukça düşüktür. Bu durumda en olası mekanizma, membranı kolayca geçebilen hidrojen peroksinin nükleusta demir veya bakır iyonları ile Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları aracılığıyla hidroksil

radikallerini oluşturmaktadır. *Nükleaz aktivasyonu* hipotezine göre de DNA hasarı oksidatif strese bağlı olarak aşırı yükselen sitozolik Ca^{2+} düzeylerinin, nükleusda Ca^{2+} -bağımlı endonükleazları aktiflemesiyle ilişkilidir. Aktiflenmiş nükleaz DNA'da kimyasal bir baz değişikliğine neden olmaksızın fragmentasyon oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar *in vivo* koşullarda her iki hipotezin de geçerli olduğunu, ortamdaki geçiş metal iyonlarının reaksiyonun hızını, mekanizmasını ve oluşan baz değişikliğinin türünü etkilediğini göstermiştir. Hücre tipi ve oksidatif stres etkenine bağlı olarak bu mekanizmalardan birinin daha öne çıktığı kabul edilmektedir (23,73,85-87).

Hücrede oluşan başlıca oksidatif DNA hasarları abazik bölgelerin oluşması, baz katılımı veya bazlarda yeniden düzenlenmeler gibi baz değişiklikleri, tek ve çift zincir kırıkları, deoksiriboz hasarı ve DNA ile protein arasında çapraz bağlanmalar oluşması olarak sıralanabilir (86). Reaktif oksijen türlerinin DNA'da 20'den fazla baz hasarına yol açtığı bildirilmiştir (88). Pirimidin bazlarının özellikle C₄-C₅ çift bağı, hidroksil radikaline karşı duyarlıdır. Pirimidin bazların oluşturduğu başlıca oksidatif pirimidin ürünleri timin glikol, urasil glikol, 5-hidroksi-2-deoksiurasil (5-OHdU), 5-hidroksi-2-deokssitidin (5-OHdC) ve hidantoinidir. Hidroksil radikalinin pürin bazlarının 4. 5. ve 8. pozisyonlarındaki karbon atomları ile reaksiyona girerek 8-hidroksi-2-deoksi-guanozin (8-OHdG), 8-hidroksi-2-deoksiadenin (8-OHdA) ve formamidopirimidinler gibi oksidatif ürünler oluşturduğu gösterilmiştir. Guanin, iyonizasyon potansiyeli en düşük, oksidasyona yatkınlığı en fazla olan DNA bileşenidir (88). Bu nedenle oksidatif baz ürünlerinden 8-OHdG, en bol miktarda oluşan ve mutajenik etkileri ayrıntılı olarak incelenmiş olanıdır (Şekil 2-4), (89). 8-OHdG'e sahip DNA bölgelerinin onarılmaması, replikasyonda guanin-adenin eşleşmesinde hatalara ve guanin-timin geçiş mutasyonlarına yol açabilmektedir. 8-OHdG, oksidatif DNA hasarının duyarlı ve direkt bir göstergesi olarak kabul edildiğinden DNA hasarının tayininde en sık kullanılan belirteçtir.



Şekil 2-4: 8-hidroksi-2-deoksiguanin (8-OHdG)

2.3. TELOMERLER ve TELOMERAZ

2.3.1. Telomerler

Telomerler ökaryotik kromozomların uçlarında bulunan, özelleşmiş tekrar dizilerinin oluşturduğu DNA bölgeleridir. Çok sayıda "TTAGGG" dizisi içeren bu heterokromatik yapılar, 1938 yılında Muller (90) tarafından tanımlanmıştır. Telomerlerin başlıca fonksiyonu kromozomların bütünlüğünü ve stabilitesini sağlamaktır. Mayoz bölünme sırasında, birinci profazın leptoten evresi boyunca telomerik bölgeler bir küme halini alarak kromozomların nükleus membranına tutunmasına ve belirli bir pozisyonu korumalarına aracılık ederler. Telomerik DNA dizileri, genomik DNA'nın diğer dizilerinden yapı ve fonksiyon bakımından oldukça farklıdır; kromozomun son kısmını rekombinasyon, yıkım ve füzyon gibi anormal durumlara karşı korurlar. Ayrıca nükleer yapılanma, gen ekspresyonu, replikasyon, tümör oluşumu, yaşlanma ve hücre bölünmesinde rol aldıkları gösterilmiştir (90-92). Telomer yapısı incelenen

organizmalarda, bu yapının temelde aynı olmakla birlikte farklı tekrar dizileri içerebileceği tespit edilmiştir. Örneğin, omurgalılarda TTAGGG dizisi, tek hücreli bir organizma olan tetrahymenada ise TTGGGG dizisi bulunmaktadır (93). Telomerik DNA farklı özellikler gösterdiğinden kendi içinde de *subtelomerik bölge* ve *esas telomerik bölge* olarak iki başlık altında incelenmektedir. Subtelomerik bölgenin DNA tekrarları, heterojen ve uzunluğu değişkendir. Örneğin, insan kromozomunun subtelomerik bölgesi 40-60 kb uzunluğunda ve TTGGGG, TGAGGG tekrar dizilerinden oluşur. Esas telomerik bölge ise 5-15 kb uzunluğunda olup (somatik hücrelerde 5kb, germ hücrelerinde 10kb) sadece TTAGGG tekrar dizisinden ibarettir (92).

Telomerleri kromozomun diğer kısımlarından ayıran önemli bir özelliği de telomerik DNA'nın hücre siklusuna bağlı olarak kaybı ve telomeraz enzimi aracılığıyla yeniden kazanılmasıdır. İnsan somatik hücrelerinde telomer dinamiği negatif olup her hücre siklusunda kaybedilen telomerik DNA miktarı, yeniden sentezlenenden fazladır (92).

2.3.2. Telomeraz

Telomer terminal transferaz ya da telomer deoksinükleotidil transferaz olarak da adlandırılan telomeraz enzimi ribonükleoprotein yapıda bir DNA polimerazdır (94,95). İlk kez 1984 yılında Greider ve Blackburn (96) tarafından tetrahymenada gösterilmiş olan bu enzim, kromozomların uçlarındaki TTAGGG tekrar dizilerinin sentezinden sorumludur. Embriyogenezi takiben somatik hücrelerin çoğunda telomeraz aktivitesi kaybolmakta ancak germ hücreleri, endometriyum, servikal epitel, epidermis, özofagus epiteli, bağırsak kriptaları ve saç folikülleri gibi yenilenebilen dokular ile kemik iliği hücreleri, hematopoetik kök hücreler ve aktive lenfositlerde telomeraz aktivitesi düşük düzeyde devam etmektedir. Düşük telomeraz aktivitesi sayesinde bu hücreler ölümsüz hücreye dönüşmeden proliferasyon kapasitelerini sürdürebilmektedir. Ölümsüzleşmiş kanser hücrelerinde ise telomeraz yeniden aktive olmaktadır (97).

Telomeraz enziminin yapısı en ayrıntılı olarak çok insanlarda incelenmiştir. Buna göre enzim 3 alt birimden oluşmaktadır; 1- RNA yapıdaki alt birim (hTR) 2- Reverse transkriptaz aktivitesine sahip alt birim (hTERT) 3- Protein yapıdaki alt birim (TP1). 550 kDa ağırlığında olan telomeraz enzimini diğer reverse transkriptazlardan ayıran en önemli özellik, kendi RNA alt birimini (hTR) kalıp olarak kullanmasıdır. hTR

yapısında 1–6 tane 5'-CUAACCCUAAC-3' dizine sahiptir ve bu dizilerden telomer DNA'sına komplementer olan 5'-CCCUAAA-3' tekrarlarını içeren 8–30 bazlık bir bölümü sentez sırasında kalıp olarak kullanılmaktadır. 1995 yılında Feng ve ark.'ları (98) tarafından klonlanan hTR geni 3. kromozomun uzun kolunda (3q26.3) yer almaktadır. Telomerazın katalitik alt birimi olan hTERT'i kodlayan gen 5. kromozomda (5p15.33) bulunmaktadır ve 7 eksona sahiptir. Bu eksonlardan sadece ilki telomeraza özgüdür, kalanı diğer revers transkriptazdakilerle benzerlik göstermektedir. Telomeraz enziminin düzenleyici alt birimi olan TP1, enzimin RNA alt birimine bağlanmaktadır (99,100).

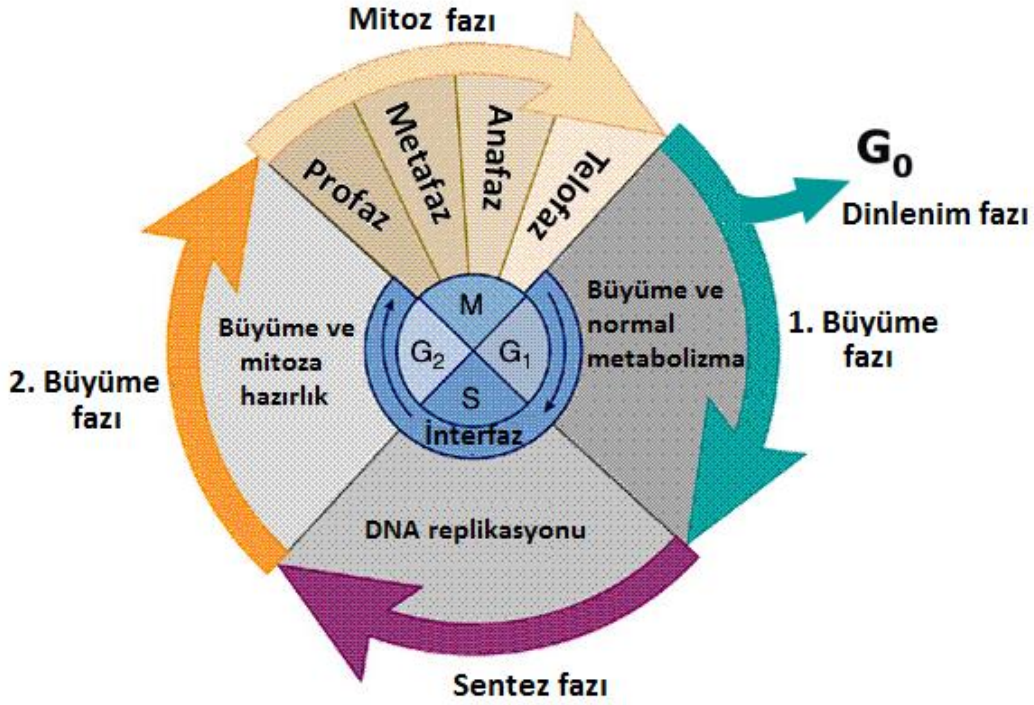
Bilindiği gibi, ökaryotik replikasyon sırasında DNA polimeraz, DNA sentezine direkt olarak başlayamaz. Replikasyonun başlayabilmesi için, DNA polimerazın bağlanabileceği 3'-OH grubunu sağlayan 8–12 bazlık bir RNA primeri gereklidir. Ancak RNA primerinin varlığında, DNA polimeraz hem kesikli sentezlenen zincirde hem de kesintisiz sentezlenen zincirde okumasını sürdürebilir. DNA sentezi sadece 5'→3' yönünde yapılabildiğinden, RNA primerinin uzaklaştırılmasından sonra, yeni sentezlenmiş çift zincirli DNA molekülünün 5' ucunda 8–12 bp kadar bir boşluk oluşmaktadır. Bu boşluk DNA polimeraz tarafından tamir edilemez. DNA'nın bu bölgesi tek zincir halinde kalır ve molekülün stabilitesini tehdit eder (96). *Replikasyon sonu problemi* olarak adlandırılan bu durum, özel replikasyon mekanizmalarının yokluğunda her replikasyonu takiben kromozomların 30-200 bp kadar kısalmasına ve sonuçta fonksiyonel genlerin kaybına yol açar (96). Lineer kromozoma sahip canlılarda *replikasyon sonu problemi*, telomeraz enzimi tarafından sentezlenen telomerler aracılığı ile aşılmaktadır. Yeni sentezlenmiş DNA molekülünün 5' ucundaki boşluğun doldurulması sırasında telomeraz, hTR alt birimindeki 8–30 bazlık kısa bir bölgesini kalıp olarak kullanmak üzere kesintisiz zincirin 3' ucundaki GT'den zengin 12–16 bazlık bölge aracılığıyla DNA'ya bağlanır. Telomerazın katalitik alt birimi olan hTERT de, yeni sentezlenen telomerik dizinin 3' yönünde kayarak bu diziyeye komplementer GGTTAG tekrar dizilerini sentezler ve 3' ucuna ekler. Daha sonra DNA polimeraz, telomerazın sentezlediği bu diziyi kalıp olarak kullanarak karşı zinciri tamamlar ve böylece 5' ucundaki boşluğun doldurulmasını sağlar (Şekil 2–5), (96,101).

2.4. TELOMER UZUNLUĞU VE TELOMERAZ İLE YAŞLANMA ARASINDAKİ İLİŞKİ

İnsan somatik hücre kültüründe, telomer boylarının her hücre bölünmesinde biraz daha kısaldığı, hücrelerin belli sayıda bölünmeden sonra çoğalma yeteneklerini kaybederek bir süre sonra öldükleri gösterilmiştir (5). Replikatif yaşlanma olarak adlandırılan bu durumun, hücre siklusunun G0/G1 fazında geri dönüşümsüz olarak durması sonucu ortaya çıktığı ve p53-p21-p19 ve p16-pRb yolaklarının aktivasyonu ile tetiklendiği bildirilmiştir (102). Her replikasyonu takiben insan somatik telomerlerinde oluşan kısılmanın, ölümsüz olan tümör hücrelerinde gözlenmemesi, telomerlerin hücre içi mitotik bir saat gibi davranarak hücrenin bölünme sayısını düzenlediği görüşünün ortaya atılmasına yol açmıştır (103). Yaşlanan hücrelerin karakteristik özelliklerinden birinin telomer uzunluğundaki değişiklikler olduğunu görüşü, genç insanlardan alınan hücrelerin, yaşlılardan alınan hücrelere göre kültür ortamında daha fazla sayıda bölünme göstermesi, uzun ömürlü türlerde hücre bölünme sayısının, kısa ömürlülerden daha fazla olması, Werner Sendromlu (erken yaşlanma sendromu) hastalarda hücre bölünmesi sayısının, normal insanlarınkinden daha az olduğunu gösterilmesi gibi bulgularla desteklemiştir. İlk kez Leonard Hayflick, normal insan fibroblastlarının ortalama 50 hücre bölünmesinden sonra gelişme ve bölünme yeteneklerini yitirdiğini (Hayflick limiti), yaşlanmış hücrelerin metabolik olarak aktif kaldığını ancak daha fazla yeni hücreler meydana getiremeyerek en sonunda öldüğünü göstermiştir (5). Olovnikov (104) yaptığı çalışmalarda bu bulguları destekleyerek her DNA replikasyonu sonucunda bütün kromozomların sonlarında fiziksel olarak bir eksilme olduğunu ve kritik bir eksilme noktasından sonra hücrenin ölümünün gerçekleştiğini ortaya koymuştur.

İyonize radyasyon, hidrojen peroksit veya organik hidroperoksitlere maruziyet, onkogen transfeksiyonu gibi çeşitli stres durumlarının p53 ve/veya p16-pRb yolaklarından birini aktifleyerek replikatif yaşlanmayı uyarabildiği gösterilmiştir (44,105-107). Fibroblast kültüründe gerçekleştirilen çalışmalarla telomer uzunluğunun dış etkenler tarafından, özellikle de oksidatif stres tarafından belirlendiği saptanmıştır (44-46). Oksidatif stres telomer boyunun korunmasında negatif etki göstermektedir. Telomerlerin akut oksidatif stres için öncelikli hedef olduğu ve bu yolla oluşan tek zincir kırıkları için bir tamir mekanizmasına da sahip olmadıkları, ılımlı düzeyde kronik oksidatif stresin ise telomer kısılmasını hızlandırdığı gösterilmiştir (44,46). Fibroblast kültürlerinde oksidatif stresin telomerlerde, telomerik olmayan kromozomal DNA'ya

göre daha fazla hasar oluşturduğu ve telomeraz aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (46). Oksidatif stresin, telomerlerde nükleaza hassas bölgeleri arttırdığı ayrıca, telomerik dizideki oksidatif DNA hasarına duyarlı ve kolayca kırılabilen GGG bölgelerinden kopmalara neden olduğu tespit edilmiştir (44,46,108). Sürekli bölünen hücrelerde, hücre siklusu mitozdan sonra G₁-S-G₂ (interfaz) ve M (mitoz) döngüsünde tekrarlanır. Hücre bölünmesini tamamlayan somatik hücreler G₀ fazında kalırlar ve S fazına geçemezler. Bu aşamadaki bir hücrede yaşlanma telomerik ve telomerik olmayan yaşlanma şeklinde iki yolla ortaya çıkabilir (92). Telomerik olmayan yaşlanma DNA hasarı, onkojenler ya da mitojenik sinyallerle ilişkilidir. Telomerik yaşlanma ise telomerik DNA'da meydana gelen kısalma ile ilişkili programlı bir süreçtir. Telomerler belirli bir kritik kısalmaya ulaştığında *disfonksiyonal telomer* olarak adlandırılırlar. Disfonksiyonel telomere sahip bir hücrede *M1* (Mortalite Evresi 1) ve *M2* (Mortalite Evresi 2) olmak üzere 2 kontrol noktası vardır; *M1* evresinde hücre döngüsü durur ve hücre yaşlanması tetiklenir. Bu evre p53, pRb gibi tümör baskılayıcı proteinlerle kontrol edilir (92). p53 hücre yaşlanmasının en önemli düzenleyici molekülüdür, hücre proliferasyonunu geçici ya da kalıcı olarak durdurur ya da hücreyi apoptoza yönlendirir. p53-p21 yolağı telomer kısalmasının başlattığı uyarı ile aktive olur ve hücreyi yaşlanmaya yöneltir. Telomer boyu bu aşamada korunabilirse hücre yaşlı olarak varlığını sürdürür ancak sikline bağımlı kinaz aktivitesi de inhibe olduğundan hücre G₀ ya da G₁ fazından S fazına geçemez (Şekil 2–6). Bu durumdaki bir hücre bölünemez ve yaşlanır (92). *M1* evresindeki bir hücrenin telomerlerinde kısalmanın devam etmesi halinde hücre *M2* evresine girer. Bu durumdaki somatik hücrelerde, telomeraz enzim aktivitesi yok denecek kadar azaldığından, telomer boyu giderek kısalır. Telomerler kromozomal devamlılığı sağlama özelliğini kayıp eder ve hücre *telomer krizi* olarak adlandırılan aşamaya girer (92). Bu aşama p53'den bağımsızdır, kromozomlarda kararsızlık ve sonuçta hücre ölümüne yol açar. Eğer *M2* noktasında hücrenin telomer boyu stabil bir halde kalırsa, hücre *M2* noktasını aşarak ölümsüzleşir ve bölünmeye devam eder. Bu olay, telomeraz enziminin regülasyonu ya da yeniden aktifleşmesi sonucu ortaya çıkar. Kanser hücreleri, *M2* evresini aşabilen hücrelerdir (92,109).



Şekil 2-6: Hücre Siklusu

Eşey hücreleri, yavru hücrelere uzunluğu tam olan kromozomları transfer etmek zorundadırlar. Bu nedenle eşey hücrelerinde telomeraz aktivitesi sürekli olarak varlığını sürdürür, bu hücreler mutasyona uğrayabilir, fakat yaşlanmazlar (16). Bu durum sperm hücrelerinin uzun telomer dizilerine sahip olduğunun ve telomer uzunluklarının istikrarlı bir şekilde korunduğunun gösterilmesiyle de doğrulanmıştır (110). Kan hücreleri gibi somatik hücrelerde ise telomer uzunluğunun yaşlanma ile azaldığı anlaşılmıştır. Bu sonuçlar, eşey hücrelerinin telomer bütünlüğünü sağladığını fakat somatik dokuların bunu yapamadıklarını göstermektedir (16). Çok hücreli hayvanların evriminde somatik hücrelerin programlı olarak yaşlanması, bu hücrelere seçici bir avantaj sağlamaktadır. Hücre büyümesi, çoğalması ve ölümü kurallara uygun olarak gerçekleştiğinden kanser olma riskini azalmaktadır (16,110).

Farklı türlerde, değişik hücre tipleriyle yapılan çalışmalarla telomer uzunluğunun canlıların yaşam süresinin belirlenmesinde evrensel bir rol oynadığının doğrulanması, akıllara pek çok soruyu getirmiştir. "Telomer uzunluğunu arttırarak sonsuz gençliğe ve canlılığa sahip olabilir miyiz?", "Telomer artışı yapay olarak sağlanırsa, yaşlanma, sıklığı yaşlanma ile artan hastalıklar ya da kanser önenebilir mi?", "Telomeraz ekspresyonu arttırılarak yaşlanma önenebilir mi, geriye

döndürülebilir mi?" gibi sorulara cevap bulmak üzere deney hayvanları ve hücre kültüründe çok sayıda araştırma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların bir kısmında, telomerazın karsinogeneze hız kısıtlayıcı basamak olduğu ve insan kanserlerinin birçoğunun telomeraz reaktivasyonu ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (99,100,111). Diğer taraftan, primer fibroblast kültürlerinde ektopik telomeraz ekspresyonunun, telomer kısalmasına bağlı hücre yaşlanmasını önlediği ve bu hücrelerin yaşam süresini uzattığı ve ayrıca hTERT ekspresyonunun neoplastik transformasyona yol açmadığı bildirilmiştir (112). Bu bulgular, telomeraz alt birimlerinin birbirinden bağımsız etkilerinin incelendiği çalışmalar ile telomerazın telomerler dışındaki etkilerinin incelendiği araştırmaların başlatılmasını sağlamıştır (112,113). Kiyono ve ark.'ları (114), primer hücre kültürlerinde telomerazın hücre proliferasyonun artırılmasından sorumlu tek faktör olmadığını, Hahn ve ark.'ları (115) da aşırı hTERT ekspresyonunun kanser oluşunu uyarmak için tek başına yeterli olmadığını göstermiştir. Daha ilginç olarak, fare embriyonik hücre kültürlerinde aşırı TERT ekspresyonunun telomerlerden bağımsız bir etki ile hücrenin strese karşı direncini arttırdığı ve antioksidan savunma kapasitesini iyileştirdiği ileri sürülmektedir (116). Diğer taraftan, oksidatif stresin telomer boyunun kısalmasında önemli bir etken olduğunun gösterilmesi, antioksidan uygulanarak telomer boyunun korunması/uzatılması çalışmalarına da hız vermiştir. Bu çalışmalarda, yirmiden fazla insan fibroblast hattında telomer kısalma hızı ile antioksidan kapasite arasında ters bir ilişki olduğu, Gpx, SOD gibi antioksidan enzimlerin telomer boyunun korunmasında önemli role sahip olduğu gösterilmiştir (117). Ayrıca fenil-*t*-bütil nitron gibi radikal tutucuların veya gama-tokotrienol gibi antioksidan etkili birleşiklerin telomer boyunun kısalmasını yavaşlattığı bildirilmiştir (117,118). Ancak antioksidanlarla yapılan çalışmalar, antioksidanların sadece mevcut telomer boyunun korunmasına katkıda bulunduğunu, replikatif yaşam süresinin uzatılmasında bir etkilerinin olmadığını ortaya koymuştur (117).

Son yıllarda telomerazın, telomerden bağımsız etkilerinin incelendiği çalışmalar da dikkat çekmektedir. Bu çalışmaların en ilgi çeken sonucu, mitokondride ekstrasnükleer bir telomerazın varlığının gösterilmesi ve bu telomerazın hücrenin sağkalımı ve oksidatif strese direnci ile ilişkili olduğudur (119,120). Telomerazın katalitik alt ünitesi olan hTERT'in fibroblastları doza ve zamana bağlı olarak oksidatif strese karşı koruduğu ve geri dönüşümlü olarak nukleus dışına atıldığı bildirilmiştir (121). Haendeler ve ark.'ları (122) hTERTin aşırı eksprese olduğu hücrelerde, nukleus

dışına çıkararak mitokondride lokalize olduğunu saptamış. Mitokondriyal hTERT'in, ılımlı stres altında mitokondride superoksit ve peroksit düzeylerinin azaltılması, membran potansiyelinin arttırılması ve mtDNA'nın korunmasında görev aldığını ileri sürmüştür.

Telomer uzunluğu, telomeraz aktivitesi ve oksidatif stres ile yaşlanma arasındaki ilişkiler konusundaki çalışmalar yoğunlaşarak devam etmektedir. 2009 yılı Nobel ödülü de *Kromozomların Telomerler ve Telomeraz Enzimi İle Nasıl Korundukları* konusundaki çalışmalarından dolayı JW Szostak, EH Blackburn ve CW Greider adlı araştırmacılara verilmesi bu konuya gösterilen ilginin ve verilen önemin bir ifadesidir (123).

2.5. YAŞLANMA ÜZERİNE BESLENMENİN ETKİLERİ

Henüz yaşlanmayı tam olarak açıklayabilen bir teori ya da yaşlanmayı önleyebilen, durdurabilen veya geri döndürebilen bir uygulama bulunmamaktadır. Yaşlanmada mitokondriyal teori, hayvan türlerinin maksimum yaşam süreleri arasındaki farkların açıklanmasında kısmen yeterli olmakta, bir yaşlanma teorisinin aydınlatması gereken neden-sonuç ilişkisini tam olarak ortaya koyamamaktadır. Bu durum, mitokondriyal ROS oluşum hızı ve oksidatif streste meydana gelen değişikliklerin yaşlanma hızını nasıl etkilediğini gösteren çalışmalara hız kazandırmıştır. Bu amaçla yapılan deneysel uygulamalar arasından besin kısıtlamasının (kalori kısıtlaması), laboratuvar kemirgenleri dahil birçok hayvan türünde ve insanlar dahil primatlarda yaşlanmayı yavaşlatan ve maksimum yaşam süresini uzatan en güçlü uygulama olduğu görülmüştür (26,27).

Besin yoluyla karbonhidrat, lipit ve proteinden sağlanan günlük toplam kalorinin, malnutrisyona neden olmadan %25–60 oranında sınırlandırılması olarak tanımlanan kalori kısıtlaması, ilk kez 1935 yılında McCay ve ark.'larının kalori kısıtlamasının farelerde maksimum yaşam süresini uzattığını gösteren makalelerinde bildirilmiştir (124). Mc Cay ve ark.'ları, %30 daha az kalori içeren diyetle beslenen iki haftalık erkek farelerde ortalama yaşam süresinin (919 gün), *ad libitum* beslenenlere (522 gün) göre %76 uzun olduğunu saptamışlar. Aynı deneysel model sıçanlara uygulandığında bu kez maksimum yaşam süresinin 969 günden 1465 güne uzadığını bildirmişlerdir (124). Bu çalışmaların iki önemli sonucu vardır:

- 1- İlk defa bir türde maksimum yaşam süresinin arttırılması başarılmıştır.

2- Kalori kısıtlaması uygulanan sıçanların davranışlarının da sağlıklı olduğu görülmüştür.

Normal beslenen sıçanların tümü 1000. günde ölürken, kalorisi kısıtlaması uygulanan sıçanların tüylerinin parlak ve düzgün olduğu, fiziksel aktivitelerinde bir kayıp olmadığı gözlenmiştir (124). Bugün mantarlar, solucanlar, böcekler, balıklar, kemirgenler ve insanlarda kalori kısıtlamasının yaşlanmayı yavaşlattığı, tümü olmasa bile yaşlılığın en fazla bilinen biyokimyasal ve fizyolojik parametrelerinde yavaşlama sağlayarak, yaş ilerledikçe görülme sıklığı artan hastalıkların ortaya çıkışını geciktirdiği çok sayıda çalışmayla gösterilmiştir (125). Yaşlanma mekanizmasının anlaşılmasında bu bulgular önemli olmakla birlikte, kalori kısıtlamasının yaşlanmayı geciktirici etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamıştır. Besin kısıtlamasının, serbest radikallerin oluşumunu azalttığı yönünde çok sayıda bilgi bulunmaktadır (28-30). Yaşa bağlı olarak ROS üretiminde ortaya çıkan artış ve/veya süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzim aktivitelerindeki azalmaların besin kısıtlamasıyla kısmen önlediği ve böylece lipid, protein ve DNA gibi hücrel makromoleküllerin oksidatif stresden korunduğu ileri sürülmektedir (28-30). Son yıllarda, kalori kısıtlaması konusunda kemirgenler özellikle de sıçanlarda yapılan çalışmalar, uzun süreli %40 besin kısıtlamasının mitokondriyal ROS üretim hızını ve hücrel makromoleküllerde ortaya çıkan oksidatif hasarı beyin, karaciğer, böbrek, kalp ve iskelet kası gibi farklı dokularda anlamlı olarak azalttığını göstermiştir (126-128). Bu etkilerin dokuya göre değişmekle birlikte kısa süreli uygulamalarda bile ortaya çıktığı, 6-7 hafta süreyle %40 besin kısıtlamasının sıçanların karaciğerlerinde mitokondriyal ROS üretim hızını ve 8-OHdG oluşumunu azalttığı, kalp dokusunda ise bu etkilerin ortaya çıkması için uygulamanın daha uzun süreli olması gerektiği bildirmiştir (126-128).

Mitokondridelerde ROS üretimi kompleks I ve III'de gerçekleşmektedir. Besin kısıtlaması uygulamasının, tüm dokularda substrat olarak pirüvat ve malat kullanımı ile ilişkili olarak ROS üretimini önlediği, süksinat ve rotenon kullanımından bağımsız olduğu bildirilmiş ve ROS üretiminin özellikle kompleks I'de anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (129). Ayrıca, besin kısıtlamasının mitokondriyal oksijen tüketimini değiştirmeksizin ROS üretimini azalttığı, bir başka ifadeyle besin kısıtlamasının uzun yaşam süreli türlerde olduğu gibi mitokondriyal solunum zincirinde ROS üretimini daha etkin olarak önlediği bildirilmiştir (129,130). Son yıllarda bazı çalışmalar ise besin

kısıtlamasının ROS üretimini azaltıcı etkilerinin mitokondri biyogenezi ile ilişkili olduğunu ve kompleks I dahil tüm elektron transport komplekslerinin miktarında bir azalmaya yol açtığını ileri sürmektedir (126,128-130).

Günümüzde kalori kısıtlamasının, yaşam süresinin uzamasında etkin olan tek uygulama olduğu kabul edilmektedir. Ancak, son yıllarda önce drozofilalarda daha sonrada böcekler ve kemirgenlerde yapılan çalışmalarla bu görüşte bazı değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Alınan besin miktarının kısıtlanması yerine, spesifik besin öğelerinin kısıtlanmasının da yaşam süresinin uzatılmasında etkin olabileceği ileri sürülmüştür (28,31,32). Bu amaçla yapılan çalışmalarda, diyete karbonhidrat eklenmesinin veya kısıtlanmasının yaşam süresini uzatıcı etkisinin çok az olduğu ya da aksine kısalttığı, lipit kısıtlamasının ise etkili olmadığı görülmüştür (33-36). Sıçan veya farelerde yapılan çalışmalarda, protein kısıtlamasının ise tıpkı kalori kısıtlamasında olduğu gibi yaşam süresini uzattığı (ortalama %20) ancak bu etkinin kalori kısıtlamasıyla sağlanandan (ortalama %40) daha az olduğunu bildirilmiştir (28). Başka bir çalışmada da, 6-7 hafta süreyle %40 protein kısıtlaması uygulanan sıçanların karaciğer mitokondrilerinde ROS üretiminin, mtDNA'da 8-OHdG düzeylerinin ve oksidatif protein hasarının azaldığı gösterilmiştir (37). Protein kısıtlamasının, maksimum yaşam süresini uzatıcı etkileri yanı sıra preneoplastik lezyon ve tümör oluşumunu azaltıcı etkilere de sahip olduğu gösterilmiştir (37). Protein kısıtlaması ile elde edilen bu bulgular, kalori kısıtlamasının yaşlanma hızını yavaşlatıcı etkilerinin yaklaşık yarısından protein kısıtlamasının sorumlu olduğu görüşünün ortaya çıkmasına yol açmıştır (28,37,131). Son yıllarda, protein kısıtlamasının sağladığı bu etkilerden sorumlu olabilecek aminoasitlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar başlatılmıştır. Zimmerman (38) ve Richie (39) metiyonin kısıtlamasının sıçan ve farelerde yaşam süresini uzattığını, Miller ve ark.'ları (40) da yaşlanma ile ortaya çıkan birçok değişikliği geciktirdiğini saptamışlardır. Bu çalışmalarda, azaltılan metiyonin miktarını kompanse etmek amacıyla diyete glutamat eklendiğinden, elde edilen sonuçların metiyonin kısıtlamasından ziyade glutamattan kaynaklandığını düşündürmüştür. Sanz ve ark.'ları (41) metiyonin kısıtlaması ile birlikte glutamat ilavesi yapıldığında mitokondriyal O₂ tüketiminin arttığını, kalori veya protein kısıtlaması yapıldığında, ya da glutamat ilavesi yapılmadan metiyonin kısıtlaması uygulandığında böyle bir etkinin oluşmadığını saptamış ve fazla O₂ tüketiminden glutamatın sorumlu olduğunu ileri sürmüştür. Diyetteki bileşenler veya toplam kaloride bir değişiklik yapılmaksızın,

Wistar sıçanların 7 hafta süreyle metyonini %40 ve %80 kısıtlanmış yemle beslendiği bir başka çalışmada, mtDNA, protein ve lipitlerde oksidatif hasar ve serbest radikal kaçışının anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (41). Yaşlanmada protein kısıtlaması ve metyonin kısıtlaması konusundaki çalışmalar artarak devam etmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN GEREÇLER

1. Dikey Elektroforez Ünitesi (Biorad® mini-Protean, USA)
2. Elektroforez güç kaynağı (Apparatus Corporation 250-90, UK)
3. Hassas terazi (Scaltec®, Germany)
4. Görüntüleme (Biorad® GS800 Calibrated Densitometer, USA)
5. Hibridizasyon fırını (Techne, UK).
6. Kemiluminometre (Berthold® Technologies, Junior LB 9509, USA)
7. Manyetik Karıştırıcı (IKA® Labortechnik RH Basic, USA)
8. Mikrotüp santrifüjü (Hettich, Germany)
9. Nanodrop spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, USA)
10. Otomatik Pipet Takımı ve Dispenser (Ependorf® ve Gilson®, USA)
11. pHmetre (HANNA® Instruments, Portugal)
12. PZR aleti (Techne TC412 Termal Cycler, Barloworld Scientific, UK)
13. Santrifüj (Heraeus, Germany)
14. Spectronic® Genesys 5 spektrofotometre- Milton Roy, US)
15. Ultraspec® 2000 spektrofotometre (Pharmaco Biotech,UK)
16. UV transilluminatör ve video kamera Modül (Vilber Lourmant, Fransa)
17. Vorteks Karıştırıcı (IKA® Works Inc. MS2 minishaker, USA)
18. Yatay elektroforez ünitesi ((Thermo EC, UK)
19. Yatay Karıştırıcı (Thermo Fisher Scientific, USA)
20. ImageJ görüntü analiz programı (National Institutes of Health, US)
21. SPSS 16.0 (Statistical Packages for the Social Sciences- Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi) (IBM, US)

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER

Kullanılan tüm kimyasal malzemeler Sigma –Aldrich (US) ve ROCHE Aplied Science (Germany) firmalarından sağlanmıştır.

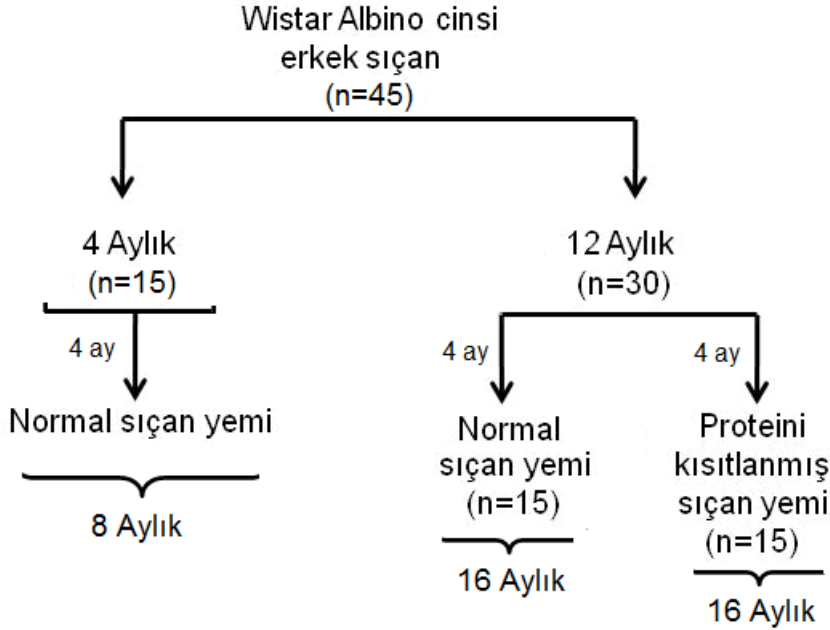
1. Agaroz
2. Akrilamid/Bisakrilamid
3. Albümin
4. Amonyum klorür
5. Aprotinin
6. Asetik asit
7. Bişiklinik asit çözeltisi (BCA)
8. Bloklama maddesi
9. Bromfenol mavisi
10. Digitonin
11. Dinitrofenilhidrazin (DNPH)
12. Etanol (%95)
13. Etidyum bromür
14. Etil asetat
15. Etilendiamintetraasetikasitdihidrat (EDTA)
16. Fosfatla tamponlanmış %0,9'luk NaCl
17. Guanidin-HCl
18. Hidroklorik asit (HCl)
19. Löpeptin
20. Luminol
21. Lusigenin
22. Maleik asit
23. Potasyum bikarbonat
24. Potasyum fosfat
26. Sitrik asit
27. Sodyum hidroksit
28. Sodyum klorür
29. Sodyum asetat
30. Sodyumdodesil sülfat
31. Triklorasetik asit
32. Tris (hidroksimetil) aminometan (Tris baz)

3.3. YÖNTEM

Çalışmamız, İ.Ü. Hayvan Etik Kurulu'nun 13.10.2006 tarihli ve 53 sayılı kararı ile onaylanmasını takiben İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan sıçanlar İ.Ü. Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü'den (DATAE) sağlandı ve hedeflenen çalışma süresi boyunca DATAE hayvan laboratuvarında beslendikten sonra yine burada sakrifiye edildi.

3.3.1. Deney Hayvanları Hazırlanması ve Çalışma Protokolü

Çalışmamızda 15 tane 4 aylık ve 30 tane 12 aylık olmak üzere toplam 45 Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanılmıştır. Dört aylık sıçanlar 4 ay süre ile normal sıçan yemi (NY) ile beslendi. 12 aylık sıçanlar rastgele 15 sıçanlık iki gruba ayrıldıktan sonra birinci gruptaki sıçanlar 4 ay süreyle NY ile beslenirken, diğer sıçanlar aynı sürede metyonin hariç, proteini %40 kısıtlanmış sıçan yemi (PKY, %12 protein içeren yem) ile beslenmiştir.



Çalışmamızda kullanılan yemler MP Biomedicals, OH, USA firmasından temin edilmiş ve içerikleri Tablo 3-1 ve Tablo 3-2'de verilmiştir. Farklı içerikteki yemlerin verilmesi dışında tüm sıçanlara içebildikleri kadar su verildi ve sıçanlar çalışma süresince yaşam döngülerine uygun olarak 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlıkta, 22 C° oda ısısında tutuldular.

Tablo 3-1 Normal sıçan yeminin içeriği (Katolog no MP-905453)

İçerik	Miktar
Kalori	3.86 kcal/g yem
Kazeinden elde edilmiş azot	%20.0
DL-Metyonin	%0.3
Sükroz	%50.0
Mısır nişastası	%15.0
Alfazel (Besinsel değeri olmayan kütle)	%5.0
Mısır yağı	%5.0
Kolin bitartarat	%0.2
Mineral karışımı (g/kg mineral karışımı)	%3.5
Kalsiyum fosfat	500.00 g
Sodyum klorür	74.00 g
Potasyum sitrat	220.00 g
Potasyum sülfat	52.00 g
Magnezyum oksit	24.00 g
Mangan karbonat	3.50 g
Demir sitrat	6.00 g
Çinko karbonat	1.60 g
Bakır karbonat	0.30 g
Potasyum iyodür	0.01 g
Sodyum selenit	0.01 g
Potasyum sülfat	0.55 g
Sükroz	118.00 g
Vitamin karışımı (g/kg vitamin karışımı)	%1.0
Tiamin hidroklorür	0.6 g
Riboflavin	0.6 g
Pridoksin hidroklorür	0.7 g
Nikotinic asit	3.0 g
D-Kalsiyum pentotenat	1.6 g
Folik asit	0.2 g
D-Biotin	0.02 g
Siyanokobalamin (B ₁₂)	0.001 g
Retinil palmitat (A)	1.6 g
DL- α -Tokoferol asetat	20.0 g
Kolekalsiferol (D ₃)	0.25 g
Menakinon (K ₂)	0.005 g
Sükroz	972.9 g

Tablo 3-2 Metyonin hariç, proteini %40 kısıtlanmış sıçan yeminin içeriği (Katolog no MP-960368)

İçerik	Miktar
Kalori	3.86 kcal/g yem
Kazeinden elde edilmiş azot	%12.0
DL-Metyonin	%0.3
Sükroz	%25.2
Mısır nişastası	%47.0
Alfasel (Besinsel değeri olmayan kütle)	%5.0
Mısır yağı	%7.0
Mineral karışımı (g/kg mineral karışımı)	%3.5
Kalsiyum fosfat	500.00
Sodyum klorid	74.00
Potasyum sitrat	220.00
Potasyum sülfat	52.00
Magnezyum oksit	24.00
Mangan karbonat	3.50
Demir sitrat	6.00
Çinko karbonat	1.60
Bakır karbonat	0.30
Potasyum iyodür	0.01
Sodyum selenit	0.01
Potasyum sülfat	0.55
Sükroz	118.0
Vitamin karışımı (g/kg vitamin karışımı)	%1.0
Tiamin hidroklorür	0.6 g
Riboflavin	0.6 g
Pridoksin hidroklorür	0.7 g
Nikotinic asit	3.0 g
D-Kalsiyum pentotenat	1.6 g
Folik asit	0.2 g
D-Biotin	0.02 g
Siyanokobalamin (B ₁₂)	0.001 g
Retinil palmitat (A)	1.6 g
DL- α -Tokoferol asetat	20.0 g
Kolekalsiferol (D ₃)	0.25 g
Menakinon (K ₂)	0.005 g
Sükroz	972.9 g

Yem uygulamasına başlamadan önce ve yem uygulaması sonlandıktan sonra sıçanlar tartılarak vücut ağırlıkları tespit edilmiştir. Çalışma süresince sıçanların günlük tükettikleri yem miktarı kayıt edilmiştir. Sıçanlar, tüyelerinin kalitesi, parlaklığı ve kaybı ile fiziksel aktiviteleri açısından aynı araştırmacı tarafından gözlemlenmiştir.

Dört ay süre ile normal sıçan yemi veya proteini kısıtlanmış sıçan yemi ile beslenen sıçanlar bu sürenin sonunda eter anestezisi ile uyutulduktan sonra servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilmiştir. Sıçanların göğüs kafesi açılarak kanları intrakardiyak yolla uzaklaştırıldıktan sonra karaciğer çıkarılmış ve soğuk %0,9'luk NaCl ile yıkanmıştır. Çıkarılan dokular tartıldıktan sonra porsiyonlara bölünerek sıvı azot içinde dondurulmuş ve deneylerin yapılacağı güne kadar -80°C 'de saklanmıştır.

3.3.2. Karaciğer Dokusunda Yapılan İncelemeler

Sıçanların karaciğer dokusundan hazırlanan homojenatlarda ve mitokondri fraksiyonunda süperoksit ve peroksit salınımı, protein karbonil düzeyleri, telomeraz aktivitesi tayin edilmiştir. Karaciğer dokusundan genomik ve mitokondriyal DNA izole edilerek genomik DNA'da, oksidatif DNA hasar göstergesi olan 8-OHdG düzeyleri ve telomer uzunluğu, mitokondriyal DNA'da ise sadece 8-OHdG düzeyleri tayin edilmiştir.

3.3.3. Karaciğer Homojenatının Hazırlanması

Karaciğer dokusu daha sonra uygulanacak yöntemeye uygun olacak şekilde hazırlanan tamponla Potter-Elvehjem homojenizatörü ile buz içinde homojenize edilerek %10'luk homojenet hazırlanmıştır.

3.3.4. Karaciğer Dokusundan Mitokondri Eldesi

Mitokondri fraksiyonu soğuk koşullarda hazırlanmış %10'luk karaciğer homojenatından hazırlanmıştır. Homojenat 4°C 'de, $700\times g$ 'de 10 dk santrifüj edilerek kaba partiküller ve hücre çekirdeğinin çökmesi sağlanmıştır. Daha sonra süpernatantın 4°C 'de, $12000\times g$ 'de 20 dk santrifüj edilmesiyle elde edilen pellet çalışmanın daha sonraki aşamalarına uygun olacak şekilde resüspande edilerek kullanılmıştır.

3.3.5. Karaciğer Homojenatı ve Mitokondride Süperoksit Salınımının Tayini

Karaciğer homojenatı ve mitokondri örneklerinde süperoksit salınımı lusigenin (9,9'-Bis N-metilakridinyum nitrat) kaynaklı kemilüminesansın ölçülmesine dayanan bir metotla tayin edilmiştir. Lusigenin ortamdan bir elektron alarak, lusigenin katyon radikaline dönüşür, bu katyon radikali de biyolojik sistem tarafından oluşturulan $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyona girerek stabil olmayan bir lusigenin dioksietan ara ürünü oluşturur. Dioksietanın dekompozisyonu ile elektronik olarak uyarılmış durumdaki iki molekül N-metil akridon açığa çıkar. Metodun prensibi bu N-metil akridonun bazal durumuna dönerken oluşturduğu ışımının kemiluminometre ile ölçülmesine dayanmaktadır (132).

Ayıracılar:

- 1- Çalışma ayıracı (): 70 mM sükröz, 220 mM mannitol, 2 mM HEPES, 2.5 mM KH_2PO_4 , 0.5 mM EDTA, %0.1 BSA içerecek şekilde hazırlanarak pH 7.4'e ayarlandıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- 2- Lusigenin çözeltisi; 5 μ M
- 3- HRP; 10 μ g/mL
- 4- Süksinat çözeltisi; 6 mM

İşlem:

0.5 mg protein içerecek şekilde sulandırılan homojenat ve mitokondri örneklerine toplam hacimleri 200 μ L olacak şekilde; 0.1 mL çalışma ayıracı, 10 μ g/mL HRP (Horse Radish Peroxidase) ve 5 μ M lusigenin pipetlendi. Mikroplak luminometreye yerleştirilerek bir dakika arayla toplam 5 dakika bazal peroksit oluşumu kaydedildi. Daha sonra tüm örnekler 6mM süksinat eklenerek bir dakika arayla toplam 5 dakika uyarılmış peroksit oluşumu kaydedildi. Beş dakika süresince kaydedilen ölçümlerden elde edilen grafiğin "eğri altı alanı" (EAA) sayım noktalarının integrali alınarak EAA değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar rölatif ışık birimi/mg doku olarak ifade edildi.

$$EAA = \Delta t[(y_1/2)+y_2+y_3+y_{n-1}+(y_n/2)]$$

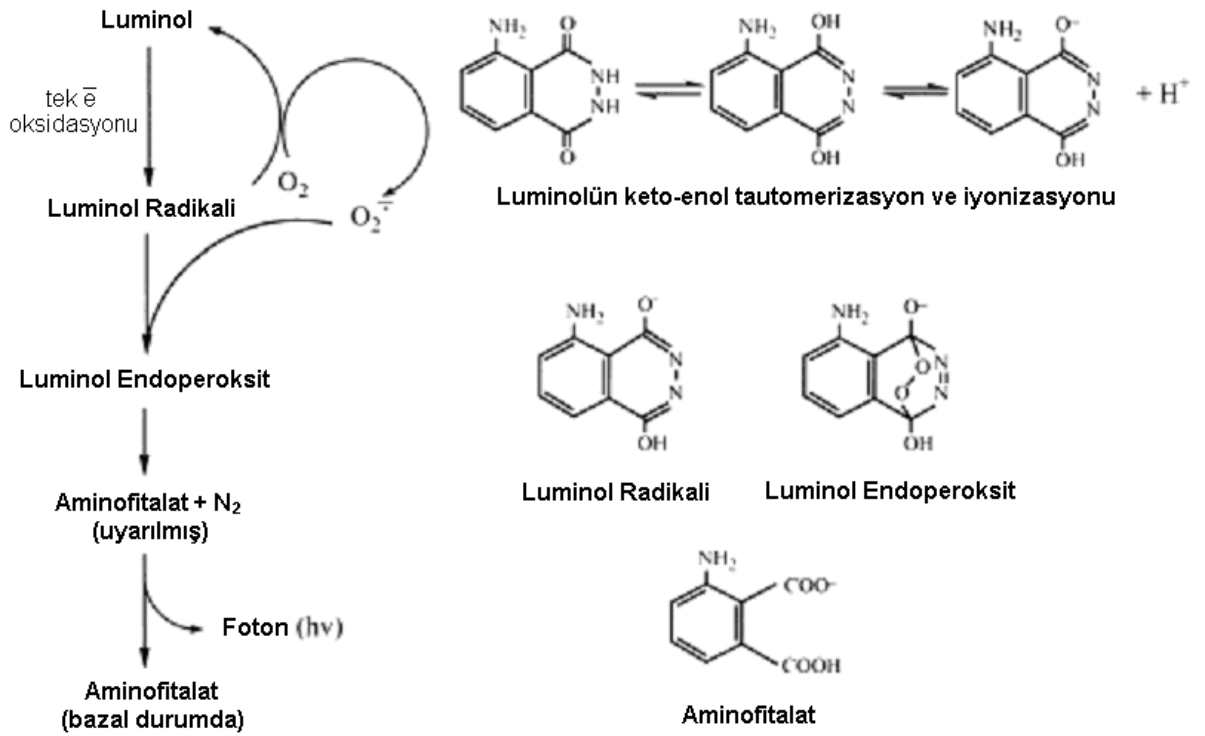
Δt : Zaman aralığı

n: Ölçüm noktalarının toplam sayısı

y_1, y_2, \dots, y_n : Uyarılmış ve uyarılmamış ölçüm değerleri arasındaki fark

3.3.6. Karaciğer Homojenatı ve Mitokondride Peroksit Salınımının Tayini

Karaciğer homojenatı ve mitokondri örneklerinde peroksit salınımı luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-fitalazindion) kaynaklı kemilüminesansın ölçülmesine dayanan bir metodla tayin edilmiştir. Metodun prensibi, luminolün H_2O_2 /peroksidaz sistemi tarafından tek elektron oksidasyonuna uğramasıyla oluşturulan luminol radikali daha sonra O_2 'i $O_2^{\bullet-}$ 'ne indirger. Oluşan $O_2^{\bullet-}$ başka bir luminol radikaliyle reaksiyona girerek stabil olmayan bir luminol endoperoksit oluşturur. Luminol endoperoksitin dekompozisyonu ile N_2 ve aminofitalat açığa çıkar (Şekil 3-1). Elektronik olarak uyarılmış durumda ki bu aminofitalatın bazal durumuna dönerken oluşturduğu ışımının kemiluminometre ile ölçülmesine dayanmaktadır (132).



Şekil 3-1: Luminol ile oluşan kemilüminesans reaksiyonları

Ayıracılar:

- 1- Çalışma ayıracı; 70 mM sükröz, 220 mM mannitol, 2 mM HEPES, 2.5 mM KH₂PO₄, 0.5 mM EDTA, %0.1 BSA içerecek şekilde hazırlanarak pH 7.4'e ayarlandıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
- 2- Luminol çözeltisi; 5 µM
- 3- Horse Radish Peroxidase (HRP); 10 µg/mL
- 4- Süksinat çözeltisi; 6 mM

İşlem:

0.5 mg protein içerecek şekilde sulandırılan homojenat ve mitokondri örneklerine toplam hacimleri 200 µL olacak şekilde; 0.1 mL çalışma ayıracı, 10 µg/mL HRP ve 5 µM luminol pipetlendi. Mikroplak luminometreye yerleştirilerek bazal peroksit oluşumu bir dakika arayla toplam 5 dakika kaydedildi. Daha sonra tüm örnekler 6mM süksinat eklenerek bir dakika arayla toplam 5 dakika uyarılmış peroksit oluşumu kaydedildi. Beş dakika süresince kaydedilen ölçümlerden elde edilen grafiğin "eğri altı alanı" (EAA) sayım noktalarının integrali alınarak EAA değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar rölatif ışık birimi/mg doku olarak ifade edildi.

$$EAA = \Delta t[(y_1/2)+y_2+y_3+y_{n-1}+(y_n/2)]$$

Δt : Zaman aralığı

n: Ölçüm noktalarının toplam sayısı

y_1, y_2, \dots, y_n : Uyarılmış ve uyarılmamış ölçüm değerleri arasındaki fark

3.3.7. Karaciğer Homojenatı ve Mitokondride Protein Karbonil Düzeyinin Tayini

Protein karbonil düzeyi, karbonillenmiş protein gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile reaksiyonu sonucu oluşan hidrazonların spektrofotometrik olarak tayinine dayanan bir yöntemle ölçülmüştür (133).

Ayıracılar:

1. Homojenizasyon tamponu (pH 7.4): 41.1 mL 0.5 M K_2HPO_4 ve 8.9 mL 0.5 M KH_2PO_4 karıştırarak hazırlanan fosfat tamponu 10 kez dilue edilerek içine %0.1 digitonin, 40 $\mu\text{g/mL}$ PMSF, 5 $\mu\text{g/mL}$ löpeptin, 5 $\mu\text{g/mL}$ aprotinin ve 1 mM EDTA eklenerek homojenizasyon için kullanıldı.
2. 20 mM Fosfat tamponu (pH 7.4): 0.5 M fosfat tamponu 25 kez dilue edilerek 20 mM fosfat tamponu hazırlandı.
3. 6 M Guanidin-HCl: 57.31 g guanidin 20mM fosfat tamponu (pH:7.4) içinde çözülerek pH'ı derişik HCl ile 2.5 ayarlandı ve 100 mL'e tamamlandı.
4. 10 mM Dinitrofenilhidrazin (DNPH): 198 mg DNPH 2.5 M HCl içinde çözülerek hazırlandı.
5. %10'luk TCA (v/v) ve %20'luk TCA (v/v)
6. Absolü Etanol/Etil Asetat (1:1) (v/v)
7. Albümin standartı: Sığır serum albümini 0.25, 0.5, 1 ve 2 mg/mL olacak şekilde guanidin-HCl içinde çözüldü.

İşlem:

Karaciğer örnekleri homojenizasyon tamponu içinde homojenize edilerek 10 ml %5'lik karaciğer homojenatı hazırlandı. Elde edilen homojenatın 5 mL'si mitokondri elde edilerek mitokondriyal protein karbonil düzeyi tayininde kullanılırken kalanı homojenatta protein karbonil düzeyi tayininde kullanıldı. Mitokondri örnekleri ve homojenatlar üzerine 4 mL DNPH eklendi. Her örnek için ayrı hazırlanan kör tüplerine ise aynı miktarda 2.5 M HCl eklendi, kör ve deney tüpleri her 15 dk'da bir vortekslenerek oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Daha sonra tüm tüplere 5 mL %20'lik TCA eklenerek buz içinde 10 dk bekletildi ve +4 °C 3000xg'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 4 mL %10'luk TCA eklenerek karıştırıldı ve aynı koşullarda tekrar santrifüj edildi. Pellet üzerine 4 mL absolü etanol/etil asetat eklendi ve santrifüj edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Son aşamada pelletlerin üzerine 2 mL 6 M Guanidin-HCl eklenerek 37 °C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüpler 3000xg'de 5dk santrifüj edilerek oluşan renk her örneğin kendi kör tüpüne karşı 365 nm'de okundu.

Örneklerin protein içeriği, kör tüpler 280 nm'de okunduktan sonra albümin ile hazırlanmış standart eğri kullanılarak saptandı. Örneklerin protein karbonil içeriği

ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı ve nmol/mg protein olarak ifade edildi.

3.3.8. 8-OHdG Düzeyi Tayini

Karaciğer genomik ve mitokondriyal DNA'larında 8-OHdG düzeyi yarışmalı ELISA prensibine dayanan ticari kit ile tayin edilmiştir (Northwest Life Science Specialties, USA Katolog No NWK-8OHDG02). Hidroliz edilerek hazırlanmış DNA örnekleri, enzimle işaretlenmiş antijen içeren çalışma ayraç ile aynı zamanda deney ortamına eklenir ve iki antijenin (8-OHdG), kuyucuğa bağlı antikora bağlanmak üzere yarışması sağlanır. Belli bir süre sonunda bağlanmayan antijenler yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra, antikora bağlanan enzimle işaretli antijenin miktarını belirlemek üzere ortama substrat eklenerek oluşan renk değişikliğinin şiddeti 450nm'de okunur. Hidroliz edilerek hazırlanan DNA örneklerinde 8-OHdG mevcutsa, kuyucuklardaki özgül antikora bu 8-OHdG bağlanacağından örnekteki 8-OHdG miktarıyla uyumlu olacak şekilde daha az renk değişikliği oluşur. Substratın oluşturduğu renk değişikliği, dolayısıyla elde edilen absorbans değeri DNA örneğinde bulunan 8-OHdG miktarı ile ters orantılıdır. Örnekteki 8-OHdG konsantrasyonu logaritmik standart eğri kullanılarak hesaplanır.

Deney 3 aşamada gerçekleşmiştir:

- A- Genomik ve Mitokondriyal DNA'nın İzolasyonu
- B- Genomik ve Mitokondriyal DNA'nın Hidrolizi
- C- 8-OHdG Düzeyinin ELISA kit ile tayini

A- Genomik ve Mitokondriyal DNA'nın İzolasyonu

DNA, hücrelerin lizis solüsyonu yardımıyla parçalanması sonucu serbestleşen DNA, RNA ve protein karışımından proteinler tuzla çöktürüldükten sonra DNA'nın elde edilmesine dayanan tuzla çöktürme yöntemiyle izole edilmiştir (134-136).

Ayırıcılar

1.PBS: 1,15 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KH_2PO_4 , 8g NaCl ve 0,2 g KCl bidistile suda çözülerek pH'ı 7.4'e ayarlandı ve 1000 mL'e tamamlandı. Otoklavlandıktan sonra, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

2.Lizis tamponu: 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5 mg/mL proteinase K içerek şekilde taze hazırlandı.

3.%1 Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi: 1g SDS tartılarak bidistile su ile 100 ml'e tamamlandı. 0.45 µm'lik filtreden süzülerek, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

4.6M NaCl çözeltisi: 35.06 g NaCl tartılarak bidistile su ile 100 ml'e tamamlandı. Otoklavlandıktan sonra, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

5.Etanol (%96 ve %70'lik)

İşlem:

Karaciğer örnekleri Potter-Elvenhjem homojenizatörü ile PBS içinde homojenize edilerek %10'luk karaciğer homojenatı hazırlandı. Homojenatlar +4°C'de, 700xg'de 10 dakika santrifüj edilerek kaba partiküllerin ve hücre çekirdeğinin çökmesi sağlandı. Pellet genomik DNA izolasyonu için kullanıldı. Süpernatant +4°C'de, 10000xg'de 20 dakika santrifüj edilerek mitokondri fraksiyonu elde edildi ve mitokondriyal DNA izolasyonu için kullanıldı.

Genomik DNA izolasyonu için hazırlanan pelletler ve mitokondri örnekleri üzerine 3 mL lizis tamponu eklenerek 37°C 'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örneklerin üzerine 2 mL 6M NaCl eklenerek 10 dk 55°C'de bekletildikten sonra 30dk 5000xg'de santrifüj edildi ve süpernatant bir başka steril tüpe aktarıldı. Protein kontaminasyonunu önlemek amacıyla bu işlem 3 kez tekrarlandı. Süpernatant üzerine 2 hacim soğuk %96'lık etanol eklenerek DNA görünür hale gelene kadar tüp alt-üst edildi. Görünür hale gelen DNA bir pipet ucu ile alındı, %70'lik alkol ile yıkandıktan sonra yeni bir tüpe aktarıldı ve açık hava da kurutulmaya bırakıldı. Daha sonra DNA bidistile suda çözüldü ve Nanodrop özellikte bir spektrofotometre ile 280 nm'de absorbansı okunarak DNA konsantrasyonu µg/mL olarak belirlendi ve çalışılincaya kadar -80°C'de saklandı.

B-Genomik ve Mitokondriyal DNA'nın Hidrolizi

Ayırıcılar:

1. 200 mM Sodyum asetat çözeltisi: 0.820 g sodyum asetat bidistile suda çözüldü ve 50 ml'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl tamponu: 6.055 g tris bidistile su ile çözülerek, pH'ı derişik HCl ile 8.5'e ayarlandı ve 50 mL'ye tamamlandı. Otoklavlandıktan sonra, oda sıcaklığında muhafaza edildi.
3. Nükleaz P1: 300 U/mL olacak şekilde hazırlandı.

4. Alkalen fosfataz: 1mg/mL olacak şekilde hazırlandı.

İşlem:

200 µg DNA içeren örnek üzerine 15µL sodyum asetat çözeltisi ve 6 U nükleaz P1 eklenerek 1 saat 37⁰C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnek üzerine Tris-HCl tamponu ve 2 U alkalen fosfataz eklendikten sonra 1 saat 37⁰C’de inkübe edildi. Büyük molekül ağırlıklı biyomolekülleri ortamdan uzaklaştırmak için tüm örnekler 10000 Da’luk filtreden geçirilerek 8-OHdG düzeyi tayini için hazır hale getirildi.

C--OHdG Düzeyinin ELISA kit ile Tayini

Ayırıcılar:

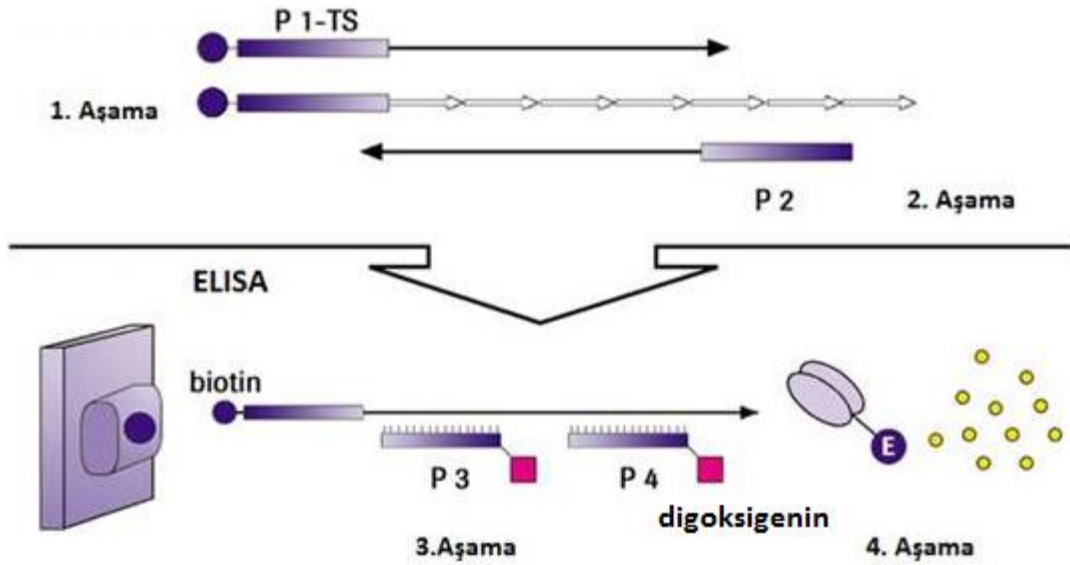
1. Standart çözelti: 0.125, 0.25, 0.5, 1, 4 ve 10 ng/mL konsantrasyonlarında saflaştırılmış 8OHdG kullanılarak standart seri oluşturuldu.
2. Primer antikor: Fareden elde edilmiş monoklonal 8OHdG antikor kit prospektüsünde belirtilen şekilde PBS ile sulandırıldı.
3. Sekonder antikor: HRP ile bağlı anti fare antikor kit prospektüsünde belirtilen şekilde PBS ile sulandırıldı.
4. TMB substratı: 3,3',5,5'tetrametilbenzidin, H₂O₂ /Sitrat/PBS içeren dilusyon tamponu ile kit prospektüsünde belirtilen şekilde sulandırıldı.
5. Yıkama tamponu:
6. Durdurma çözeltisi: 1 M fosforik asit

İşlem:

8-OHdG ile kaplanmış kuyucuklara 50 µL hidroliz edilmiş DNA örnekleri ve primer antikor yüklendi ve +4⁰C’de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklar yıkandı ve ortama 100 µL HRP ile bağlı sekonder antikor eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Yıkama işleminden sonra örneklerin üzerine 100 µL TMB substratı eklendi, 15 dk inkübasyonu takiben ortama durdurma çözeltisi eklendi ve oluşan renk 450 nm’de ELİSA okuyucusunda kör’e karşı okundu. Örnekteki 8-OHdG konsantrasyonunun kit prospektüsünde belirtilen şekilde hazırlanan logaritmik standart eğri kullanılarak saptandı. Sonuçlar ng/mL olarak ifade edildi.

3.3.9. Telomeraz Aktivitesi Tayini

Karaciğer örneklerinin telomeraz aktivitesi telomerik tekrar amplifikasyon protokolüne (TRAP) dayanan ticari bir fotometrik ELISA kiti ile (TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS kiti, Roche Applied Science, Germany Katolog No;12013789001) tayin edilmiştir. Telomeraz enziminin telomerik tekrar dizilerini (TTAGGG) biotin işaretli sentetik P1-TS primerinin 3' ucuna eklemesini takiben elongasyon ürünleri P1-TS ve P2 primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı ve 216 baz çifti içeren ürün elde edildi. PCR ürünü telomerik tekrar dizilerine özgün olan digoksinin işaretli problarla hibridize edildikten sonra oluşan ürün streptavidin kaplı kuyucuklara pipetlendi. Çalışma ortamına Anti-DIG-HRP konjuge antikor ve peroksidaza özgün substrat eklenerek inkübe edilmesini takiben reaksiyon durdurularak, oluşan ürün 450 nm'de ELISA okuyucuda okundu (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: Telomeraz aktivitesi tayininin şematik gösterimi

Tüm işlemler kit kitapçığında belirtilen şekilde ve kit içeriğinde sağlanan ayıraçlar ile üreticinin önerdiği şekilde 4 aşamada gerçekleştirildi.

- A- Karaciğer homojenatının hazırlanması
- B- TRAP reaksiyonunun gerçekleştirilmesi
- C- Telomerik dizilerin elektroforetik olarak ayrıştırılması ve görüntülenmesi

D- Telomeraz aktivitesinin ELISA yöntemi ile tayin edilmesi

A- Karaciğer Homojenatının Hazırlanması

30 mg karaciğer dokusu steril bir kap üzerinde parçalandıktan sonra üzerine 200 µL soğuk lizis tamponu eklenerek Potter-Elvehjem homojenizatörü ile buz içinde homojenize edildikten sonra 30 dk buz üzerinde inkübe edildi ve +4 °C'de 20 dk 16000xg'de santrifüj edildi. 175 mL süpernatant temiz bir tüpe aktarılarak BCA yöntemi ile protein içerikleri tayin edildi ve örnekler daha sonraki aşamalar gerçekleştirilinceye kadar sıvı azotta dondurulduktan sonra -80°C'de saklandı.

B- TRAP Reaksiyonu

Ayırçlar:

1. DNaz içermeyen RNaz çözeltisi
2. Reaksiyon karışımı (2x): Biotinlenmiş telomeraz substratı (P1-TS), primer 2 (P2), nükleotid ve Taq DNA polimeraz içeren çözelti.
3. Internal standard (IS): 216 bp'lik DNA dizisi içeren çözelti.
4. Pozitif kontrol: 0.001 amol/µL

İşlem:

Telomerazı inaktive ederek her örneğin negatif kontrolünü hazırlamak için 6 µg protein içeren örnekler DNaz içermeyen RNaz eklenerek 30 dk süre ile 37°C'de inkübe edildi. Negatif kontroller, kit içeriğindeki pozitif kontroller ve 6 µg protein içeren örnekler 25 µL reaksiyon karışımı ve 5 µL internal standart pipetlendi ve toplam deney ortamı nükleaz içermeyen su eklenerek 50 µL'e tamamlandı. Tüm tüpler PCR cihazına yerleştirilerek 30 döngülük reaksiyonlar, 94°C'de 30 sn, 50°C'de 30 sn, 72°C'de 90 sn olacak şekilde gerçekleştirildi.

C-Telomerik Dizilerin Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) ile Ayrıştırılması ve Gümüş Boyama Tekniğiyle Görüntülenmesi

Çalışmanın bu aşaması TRAP reaksiyonunun etkin şekilde gerçekleştiğini kontrol etmek amacıyla kit üreticileri tarafından önerilmekteydi. Bu aşamada altı nükleotidlik telomer dizileri PAGE ile ayrıştırıldı ve gümüş boyama yöntemi ile boyanarak

görüntülendi. Her örnek için yeterli miktarda PCR ürününün oluştuğu görüldükten sonra ELISA aşamasına geçildi. (Şekil 3-3) (137-139).

Ayrıraçlar:

1. Stok akrilamid-bisakrilamid çözeltisi (%30): 29 g akrilamid ve 1 g bisakrilamid 60 ml bidistile suda çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı.
2. TAE Tamponu (Tris-asetik asit-etilen diamin tetra asetat tamponu, 10x): 48.4 gr Tris-baz, 11.42 ml glasiyel asetik asit üzerine 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) eklenerek 1 litreye tamamlandı. 120C°de 15 dk otoklavlandıktan sonra elektroforez tamponu olarak kullanıldı.
3. Amonyum persülfat çözeltisi (APS): 100 mg APS steril tüpde 1 ml'ye tamamlandı.
4. N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED) çözeltisi:
5. Yükleme Tamponu: %0.25 bromofenol mavisi ve %30 gliserol içerecek şekilde hazırlandı.
6. DNA marker (0.5 mg/ml): 8-587 bp aralığında farklı büyüklükte 22 DNA dizisi içeren çözelti.
7. Sabitleme çözeltisi: %10 asetik asit çözeltisi, 10 ml glasiyel asetik asit bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
8. Gümüş nitrat çözeltisi: 100 mg AgNO₃ üzerine 500µl %37'lik formaldehit eklenerek bidistile suyla 100 ml'ye tamamlandı.
9. Görüntüleme çözeltisi: 25 g NaCO₃, 2 mg Na₂S₂O₃ ve 100µl %37'lik formaldehit bidistile suyla 1000 ml'ye tamamlandı.
10. Durdurma çözeltisi: 2 g glisin ve 0.5 g EDTA bidistile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

İşlem:

Bir erlen mayer içinde 4 ml stok akrilamid-bisakrilamid çözeltisinin üzerine 2.5 ml TAE tamponu, 4.5 ml bidistile su eklendi. Kullanılmadan hemen önce bu çözeltiliye 50 µl APS ve 10 µl TEMED katılarak %12'lik jel hazırlandı. İyice temizlenerek hazırlanmış iki cam plak arasına jel yavaşça döküldü ve jel yüzeyinin düzgün olmasının sağlamak üzere üstüne n-butanol konuldu ve jel polimerize olmasını takiben n-butanol uzaklaştırıldı. Polimerize olan jelin üzerine, bir erlen mayer içinde karıştırılan 1.5 ml stok akrilamid-bisakrilamid çözeltisi, 2.5 ml TAE tamponu, 6 ml bidistile su ile kullanılmadan hemen önce katılan 50 µl APS ve 10 µl TEMED içeren %4.5'lük üst jel döküldü. Kuyucukları

oluşturmak üzere üst jele taraklar yerleştirildikten sonra polimerize olması beklendi. Daha sonra cam plaklar elektroforez tankına yerleştirildi ve tanka 10 kez sulandırılmış TAE tamponu (1xTAE) eklendi. Tarak üst jelden dikkatlice çıkarılarak kuyucuklara, eşit hacim yükleme tamponuyla sulandırılmış 5 µl kesim ürünü veya marker yüklendi. Örnekler, üst jelden alt jele geçene kadar 80 voltda 1 saat, alt jele geçtikten sonra 120 voltda 2.5 saat süreyle yürütüldü. Ayrılan DNA bantları gümüş boyama tekniği ile görüntülendi. Bu amaçla PAGE sonucu elde edilen jel 30 dk sabitleme çözeltisinde bekletildikten sonra 5 dk süreyle 3 kez bidistile suyla yıkandı. Jel, gümüş nitrat çözeltisine alınarak 30 dk bekletildi ve tekrar 5 dk süreyle 3 kez bidistile suyla yıkandı. Daha sonra görüntü oluşuncaya kadar (2–5 dk) jel görüntüleme çözeltisinde bekletildi. DNA'nın sarı zeminde kahverengi-siyah bantlar (Şekil 3-3) halinde görülmesinden sonra jel durdurma çözeltisine alınarak çalışmanın bir sonraki aşamasına geçildi.



Şekil 3-3: DNA bantlarının gümüş boyama tekniği ile elde edilen görüntüsü.

M: Marker; A ve C: Örnekler; B: Pozitif kontrol; D: Negatif kontrol

D-Telomeraz Aktivitesinin ELISA Yöntemi ile Tayini

Ayırıcılar:

1. Denatürasyon çözeltisi
2. Hibridizasyon tamponu T
3. Hibridizasyon tamponu IS

4. Yıkama çözeltisi
5. Anti-DIG-HRP: Koyundan elde edilmiş HRP bağlı poliklonal antikor
6. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrat çözeltisi
7. Durdurma çözeltisi:

İşlem:

Tüm örnekler ve pozitif kontroller için 2.5 µL PCR ürünü iki ayrı tüpe pipetlendikten sonra üzerlerine 10 µL denatürasyon solusyonu eklendi ve 10 dk süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnek ve pozitif kontrol tüplerinin birine ve negatif kontrollere hibridizasyon tamponu T, örnek ve pozitif kontrollerin diğer tüplerine ise hibridizasyon tamponu IS eklenerek karıştırıldı. Kitin önerdiği pipetleme şemasına sadık kalınarak örneklerden 100 µl streptavidin kaplı kuyucuklarına aktarıldı ve 2 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hibridizasyon çözeltisi tamamen uzaklaştırılarak tüm kuyucuklara 100 µl Anti-DIG-HRP çözeltisi eklendi ve 30 dk süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Anti-DIG-HRP çözeltisi uzaklaştırılarak 100 µl HRP substrat solusyonu eklendi ve 15 dk süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu sürenin sonunda reaksiyon durdurma çözeltisi ile durdurularak oluşan renk 450nm'de okundu. Rölatif Telomeraz Aktivitesi (RTA) kit prospektüsünde belirtilen formülle hesaplandı ve ünite (U) olarak ifade edildi.

$$RTA = (A_S - A_{S,0}) / A_{S,IS} \times 100 / (A_{TS8} - A_{TS8,0}) / A_{TS8,IS}$$

A_S : Örnek absorbansı

$A_{S,0}$: Örneğin negatif kontrolünün absorbansı

$A_{S,IS}$: Örneğin IS absorbansı

A_{TS8} : Pozitif kontrolün absorbansı

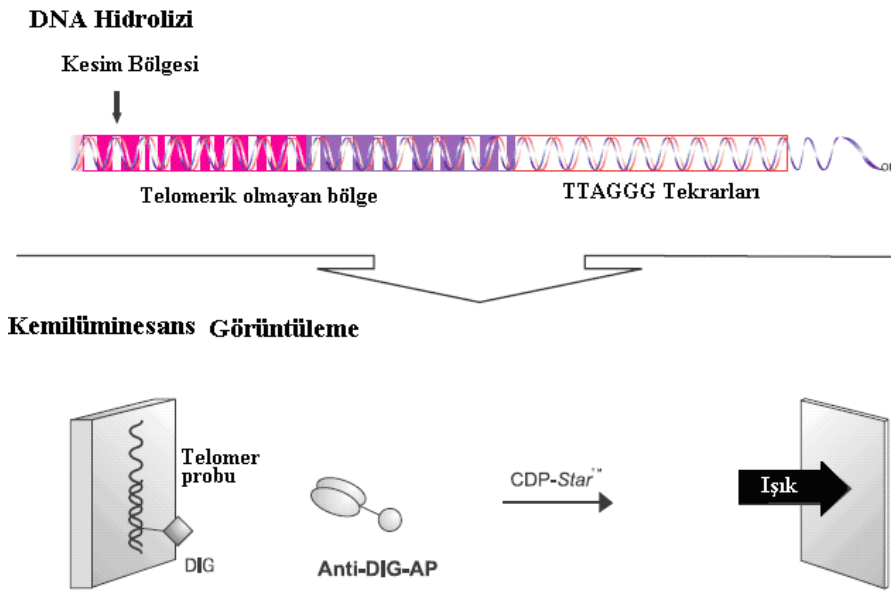
$A_{TS8,0}$: Lizis tamponunun absorbansı

$A_{TS8,IS}$: Pozitif kontrolün IS absorbansı

3.3.10. Telomer Uzunluğunun Tayini

Karaciğer örneklerinin telomer uzunluğu Southern Blot tekniğine dayanan ticari kitle tayin edilmiştir (TeloTAGGG Telomere Length Assay kiti, Roche Applied Science, Germany Katolog No; 12 209 136 001). Bu tekniğin ilk aşamasında genomik DNA

izole edilerek restriksiyon enzimleri ile muamele edildi. Bu işlem sonucu, telomerik olmayan DNA küçük parçalara ayrılırken kesim enzimleri tarafından tanınmayan telomerik DNA bütünlüğünü korudu. Elde edilen ürünler jel elektroforezi ile ayrıldıktan sonra naylon bir membrana transfer edilmek üzere blotlandı. Transfer edilen DNA parçaları telomerik tekrar dizileri için spesifik digoksinin (DIG) işaretli problemlerle işaretlenerek DIG spesifik antikorla inkübe edildi. DIG işaretli telomerler uygulama prosedüründe belirtildiği şekilde karanlık odada X-ışını film kasetine röntgen filmiyle beraber yerleştirildi. Bu sayede membrana transfer olan inkübasyon ürünlerinin yaydığı ışığa X-ışını filminde bantlar halinde görüntüledi. Bu bantların analizi Boğaziçi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde Biorad® GS800 Calibrated Densitometer sistemiyle görüntüledi ve bu sistemdeki Quantity One 4.6® programı kullanılarak kantitatif tayin yapıldı (Şekil 3-4).



Şekil 3-4: Telomer uzunluğu tayininin şematik gösterimi

Deney, kitin önerdiği şekilde 5 aşamada gerçekleştirildi.

- A-DNA izolasyonu
- B-DNA'nın enzimatik kesimi ve elektroforezle ayrıştırılması
- C-DNA parçalarının naylon membrana Blotlanması
- D-Hibridizasyon aşaması

E-Görüntüleme aşaması

A- Genomik DNA İzolasyonu

Bu aşama kit üreticisinin önerdiği şekilde tuzla çöktürme yöntemiyle izole edilmiştir (134-136).

Ayırıklar:

1. Fosfatla tamponlanmış %0,9'luk NaCl (PBS): 1,15 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KH_2PO_4 , 8g NaCl ve 0,2 g KCl bidistile suda çözülerek pH'ı 7.4'e ayarlandı ve 1000 mL'e tamamlandı. Otoklavlandıktan sonra, oda sıcaklığında muhafaza edildi.
2. Lizis tamponu: 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5 mg/mL proteinaz K içerek şekilde taze hazırlandı.
3. %1 Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi: 1g SDS tartılarak bidistile su ile 100 ml'e tamamlandı. 0.45 μm 'lik filtreden süzülerek, oda sıcaklığında muhafaza edildi.
4. 6M NaCl çözeltisi: 35.06 g NaCl tartılarak bidistile su ile 100 ml'e tamamlandı. Otoklavlandıktan sonra, oda sıcaklığında muhafaza edildi.
5. Etanol (%96 ve %70'lik)

İşlem:

Karaciğer örnekleri Potter-Elvenhjem homojenizatörü ile lizis tamponu içinde homojenize edilerek %10'luk karaciğer homojenatı hazırlandı ve homojenatlar 37°C 'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örneklerin üzerine 2 mL 6M NaCl eklenerek 10 dk 55°C'de bekletildikten sonra 30dk 5000xg'de santrifüj edildi. Süpernatant, dikkatli bir şekilde bir başka steril tüpe aktarıldı. Protein kontaminasyonunu önlemek amacıyla bu işlem 3 kez tekrarlandı. Süpernatant üzerine 2 hacim soğuk %96'lık etanol eklenerek DNA görünür hale gelene kadar tüp alt-üst edildi. Görünür hale gelen DNA bir pipet ucu alındı, %70'lik alkol ile yıkandıktan sonra yeni bir tüpe aktarıldı ve açık hava da kurutulmaya bırakıldı. Daha sonra DNA bidistile suda çözüldü ve Nanodrop özellikte bir spektrofotometre ile 280 nm'de absorbansı okunarak DNA konsantrasyonu $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi ve çalışılincaya kadar -80 °C'de saklandı.

B-DNA'nın Enzimatik Kesimi ve Elektroforezle Ayırılması

Ayırıcılar:

1. Kesim enzimleri: Hinf I ve Rsa I karışımı
2. Kesim tamponu
3. Elektroforez yükleme tamponu
4. DIG işaretli moleküler marker: 81-21.226 baz çifti arasında değişen, farklı uzunlukta 30 DNA dizisi içeren çözelti
5. TAE Tamponu (Tris-asetik asid-etilen diamin tetra asetat tamponu, 10x): 48.4 gr Tris-baz, 11.42 ml glasiyel asetik asit üzerine 20 ml 0.5 M EDTA (pH:8.0) eklenerek 1 litreye tamamlandı. Otoklavlandıktan sonra elektroforez tamponu olarak kullanıldı.
6. 0.25 M HCl çözeltisi: 250µL HCl bidistile su ile 12 mL'ye tamamlandı.
7. Nötralizasyon çözeltisi (pH 7.4): 60.55 g Tris-baz ve 175.32 g NaCl bidistile suda çözülerek pH'ı 7.5'e ayarlandı ve 1000 mL'e tamamlandı. 0.45 µm filtreden süzülerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.
8. Denatürasyon çözeltisi: 20 g NaOH ve 872 g NaCl bidistile suda çözülerek, 1000 mL'e tamamlandı. 0.45 µm filtreden süzülerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

İşlem:

Sıçan karaciğer dokusundan izole edilen 2 µg gDNA üzerine, 20 U/µL olacak şekilde kesim enzimi karışımı ve 2 µL kesim tamponu eklenerek 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 4 µL elektroforez yükleme tamponu eklenerek reaksiyon durduruldu. Kesim ürünleri ve marker %0.8'lik agaroz jele yüklenerek TAE tamponu içinde 100 volt'luk elektrik akımında yürütüldü. İşlem sonunda DNA bantları UV-transilimünatör altında kontrol edildi ve jelin boyutları cetvel ile ölçüldü. Marker kısmı kesilerek işaretlenen jel 10 dk 0.25 M HCl çözeltisinde bekletildikten sonra 2 kez bidistile suyla yıkandı, 2 kere 15 dk süreyle denatürasyon çözeltisinde bekletildi ve 2 kere bidistile suyla yıkandı. Daha sonra 2 kere 15 dk süreyle nötralizasyon çözeltisinde bekletilen jel naylon membrana blotlama aşamasına hazır hale geldi.

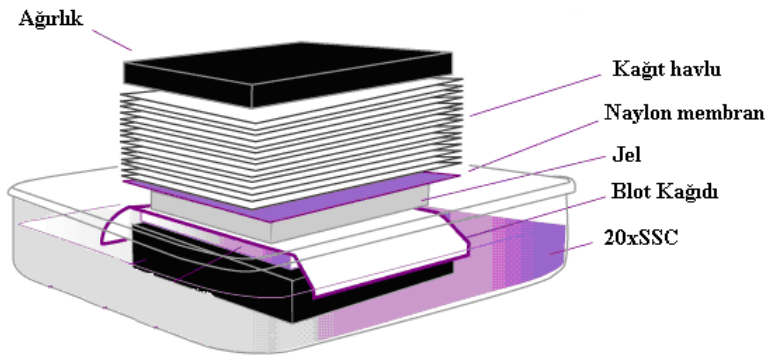
C- DNA Parçalarının Naylon Membrana Blotlanması

Ayırçılar:

1. Sodyum sitrat-sodyum klorür çözeltisi (SSC, pH 7.0, x20): 88.2 g Sodyum sitrat ve 175.32 g NaCl bidistile suda çözülerek pH:7.0'a ayarlandı ve 1000 mL'e tamamlandı. Otoklavlandıktan sonra, oda sıcaklığında muhafaza edildi.
2. SSC x2: 20x SSC bidistile su ile 10 kez dilue edilerek hazırlandı.
3. %10 Sodyum dodesil sülfat çözeltisi (SDS): 10g SDS bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı. 0.45 µm'lik filtreden süzöldükten sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi.

İşlem:

Blotlama işlemi kapiller transfer tekniği ile gerçekleştirildi. İşlemin başlangıcında jel boyutunda bir naylon membran, 4 blot kağıdı, boyutları jelden 5 cm daha büyük bir blot kağıdı ve bol miktarda kağıu hazırlandı. Hazırlanan membranın köşesi kesilerek kurşun kalemle işaretlendikten sonra membran 5 dk süreyle 2 kez bidistile su ile yıkandı, sonra 5 dk süreyle 2 kez SSC çözeltisinde bekletildi. Elektroforez tankı x20 SSC ile doldurularak büyük boyutlu blot kağıdı ıslatıldı ve kenarları tampon ile temas edecek şekilde tanka yerleştirildi. Blot kağıdının üzerine jel, üstüne aynı boyuttaki membran ve blot kağıtları yerleştirildi. En üste kağıt havlular eklenerek, eşit basınç sağlayacak şekilde ağırlık yerleştirildi (Şekil 3-5). Jeldeki bantların ıslak blot kağıdındaki tamponun kılcal etkisiyle hiçbir elektriksel güç harcanmadan membrana aktarılması sağlamak üzere tankın üstü kapatılarak gece boyu bekletildi. Blotlama işleminden sonra DNA bantlarının sabitlenmesi için membranın her 2 yüzü UV altında 30 sn tutulduktan sonra 80°C'de 2 saat inkübe edildi.



Şekil 3-5: DNA parçalarının membrana blotlanması işleminin şematik gösterimi

D-Hibridizasyon Aşaması

Ayırçalar:

1. Prehibridizasyon çözeltilisi:
2. Telomer probu: DIG işaretli, telomere özgü spesifik prob.
3. Hibridizasyon çözeltilisi: Prehibridizasyon çözeltilisi üzerine prob eklenerek hazırlandı.

İşlem:

Prehibridizasyon işlemi için x2 SSC ile ıslatılmış mesh membran içine sarılan membran hibridizasyon tüpüne yerleştirildi ve üzerine 20 mL prehibridizasyon solusyonu eklenerek 42 °C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda prehibridizasyon çözeltilisi boşaltıldı. Hibridizasyon işlemi için 50 µL bidistile su içine pipetlenen 2 µL telomer probu 95°C'de 10 dk denatüre edildi. Denatüre edilen probun üzerine 10 mL hibridizasyon çözeltilisi eklendi ve hibridizasyon tüpünün içine yerleştirildi. Membran gece boyunca 42°C'de bu çözeltili içinde inkübe edildi.

E-Kemilüminesans görüntüleme

Ayırçalar:

1. I. Yıkama çözeltilisi: 100 µL %10 SDS ve 10 mL x20 SSC bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
2. II. Yıkama çözeltilisi: 100 µL %10 SDS ve 1mL x20 SSC bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
3. III. Yıkama çözeltilisi: Kit içeriğinde kullanıma hazır olarak bulunmaktaydı.
4. Maleik asit tamponu: 11,61 g maleik asit ve 8.7 g NaCl bidistile suda çözülerek pH 7.5'e ayarlandıktan sonra 1000 mL'ye tamamlandı. 0.45 µm'lik filtreden süzöldükten sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi.
5. Bloklama çözeltilisi: 10g Blocking maddesi maleik asit tamponu içinde çözüldü. Otoklavlandıktan sonra, +4°C'de muhafaza edildi.
6. Tesbit çözeltilisi: Kit içeriğinde kullanıma hazır olarak bulunmaktaydı.
7. Anti-DIG-AP: Koyundan elde edilmiş, alkalın fosfataz bağlanmış poliklonal antikorun F_{ab} parçaları
8. Substrat çözeltilisi: Kemilüminesans substrat

İşlem:

Hibridizasyon sonrası, membran I. yıkama çözeltisiyle oda sıcaklığında 2 kere 5 dk süreyle daha sonra 50°C’de II. yıkama çözeltisiyle 2 kez 5 dk süreyle yıkandı ve 30 dk bloklama çözeltisinde bekletildi. Bloklamanın ardından 30 dk anti-DIG-AP çözeltisinde bekletilen membran III. Yıkama çözeltisiyle 2 kere 15 dk süreyle yıkandı ve 5 dk tesbit çözeltisinde bekletildi. Daha sonra hibridizasyon çantasına yerleştirilen membranın üzerine 3 mL substrat çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. Kiti uygulama prosedüründe belirtildiği şekilde membran karanlık odada X-ışını film kasetine röntgen filmiyle beraber yerleştirildi ve 10 dk süre ile filme ışımaya yapması sağlandı. Transfer olan telomerik DNA parçalarının yaydığı ışımaya X-ışını filminde bantlar halinde görüntülendi. Bu bantlar Biorad® GS800 Calibrated Densitometer sistemiyle görüntülendi ve bu sistemdeki Quantity One 4.6® programı kullanılarak kantitatif tayin yapıldı ve telomer uzunlukları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar kilobaz (kb) olarak ifade edildi.

$$\overline{\text{TRF}} = \frac{\sum (\text{OD}_i)}{\sum (\text{OD}_i / L_i)}$$

TRF: Telomer uzunluğu

OD_i: Seçilen alanın yoğunluğu

L_i: Seçilen alanın boyu

3.3.11. Protein Düzeyinin Tayini

Alkali koşullarda bakır iyonlarının peptid bağlarıyla yaptığı komplekslerin bişikonik asitle (BCA) oluşturduğu menekşe mavisi-mor rengin 562 nm’de okunması prensibine dayanmaktadır (140).

Ayrıçlar:

1. BCA (pH: 11.25): Sodyum bişikonat, sodyum karbonat, sodyum tartarat içeren ticari çözelti kullanıldı.

2. Çalışma ayıracı: 50 mL bişikonik asit çözeltisine 1 mL %4'lük CuSO₄ eklenerek hazırlandı.
3. Protein standardı: 1 mg/mL'lik stok bovine serum albumin çözeltisi farklı oranlarda sulandırılarak 100, 200, 400, 800 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı.

İşlem:

Polistren plaklar üzerindeki kuyucuklara 200 µl çalışma ayıracı ve 10µl sulandırılmış doku homojenatları veya mitokondri örnekleri pipetlenerek 30 dakika 37C°'de inkübe edildi ve oluşan rengin absorbansı 550nm'de okundu. Örneklerin protein konsantrasyonları elde edilen standart eğri kullanılarak mg protein/mL olarak hesaplandı.

3.4. İSTATİSTİKİ ANALİZLER

İstatistiki analizler SPSS 16.0 for Windows paket programı ile yapıldı. Sonuçlar Ortalama ± SD olarak verildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov ve Shapira-Wilk testleri ile denetlendi ve normal dağılım göstermediklerinin tespit edilmesi üzerine istatistiki değerlendirmeler için nonparametrik testler kullanıldı. Çoklu grup karşılaştırmaları Kruskal-Wallis testi ile yapıldı, anlamlı sonuç elde edilen parametrelerde ikili karşılaştırmalar Post-hoc Mann-Whitney U testi ile yapıldı. p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

- Çalışmanın başlangıcında 4 aylık olan sıçanlar 4 ay süreyle normal yemle beslenirken 12 aylık sıçanlar iki gruba ayrıldı; ilk gruptaki sıçanlar 4 ay süreyle normal yemle beslendi, diğer gruptaki sıçanlar ise aynı sürede proteini %40 azaltılmış yemle beslendi, ancak normal ve proteini kısıtlanmış yem aynı miktarda metyonin içermekteydi. Çalışmanın sonunda 8 ve 16 aylık olan sıçanların günlük tükettiği yem ve su miktarları çalışma süresince kaydedilmiştir. Farklı yaşta olan ve farklı yemlerle beslenen 3 grup sıçan arasında günlük tüketilen yem miktarları açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.
- Sıçanlar, çalışma süresince tüylerinin kalitesi, parlaklığı ve kaybı ile fiziksel aktiviteleri açısından aynı araştırmacı tarafından gözlemlenmiştir. Takibi yapılan bu parametrelerde çalışma süresince bir değişikliğe rastlanmamıştır. Çalışma gruplarındaki sıçanlardan hiçbiri ölmemiştir.
- Normal ve proteini kısıtlanmış yemle beslenen sıçanların vücut ağırlıkları çalışmanın başlangıcında ve 4. ayın sonunda, sakrifiye edilmeden önce ölçüldü. Sıçanların çalışmanın başlangıcında ve 4. ayın sonundaki vücut ağırlıkları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Normal yem (NY) ve proteini kısıtlanmış yemle (PKY) beslenen sıçanların çalışmanın başlangıcında ve 4. aydaki vücut ağırlıkları (g), (Ortalama ± SD).

	4 aylık-NY (n=15)	12 aylık-NY (n=15)	12 aylık-PKY (n=15)
Başlangıç	346 ± 35,5	374 ± 42,5	404 ± 34,7
4. Ay	367 ± 49,7	390 ± 45,9	399 ± 63,3

4.1. KARACİĞER HOMOJENATI VE MİTOKONDRİSİNDE SÜPEROKSİT SALINIMI İLE İLGİLİ BULGULAR

A- Karaciğer Homojenatından Elde Edilen Bulgular (Tablo 4-2, Şekil 4-1)

- NY ile beslenen sıçanların karaciğer homojenatında süperoksit salınımı yaş ilerledikçe anlamlı olarak artmıştır. NY ile beslenen 8 ve 16 aylık sıçanlar birbiriyle karşılaştırıldığında, 16 aylık sıçanların karaciğer homojenatında süperoksit salınımının %25 daha fazla olduğu saptanmıştır.
- PKY ile beslenme, aynı yaştaki sıçanların karaciğer homojenatında süperoksit salınımını anlamlı olarak azaltmıştır. NY ve PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında, PKY ile beslenen sıçanların karaciğer homojenatında süperoksit salınımının %16 daha düşük olduğu saptanmıştır.
- 4 ay boyunca PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlarla NY ile beslenen 8 aylık sıçanların karaciğer homojenatında süperoksit salınımının karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. Bu durum PKY ile beslenmenin yaş ilerledikçe süperoksit salınımında ortaya çıkan artışın önlenmesinde etkili olduğunu göstermiştir.

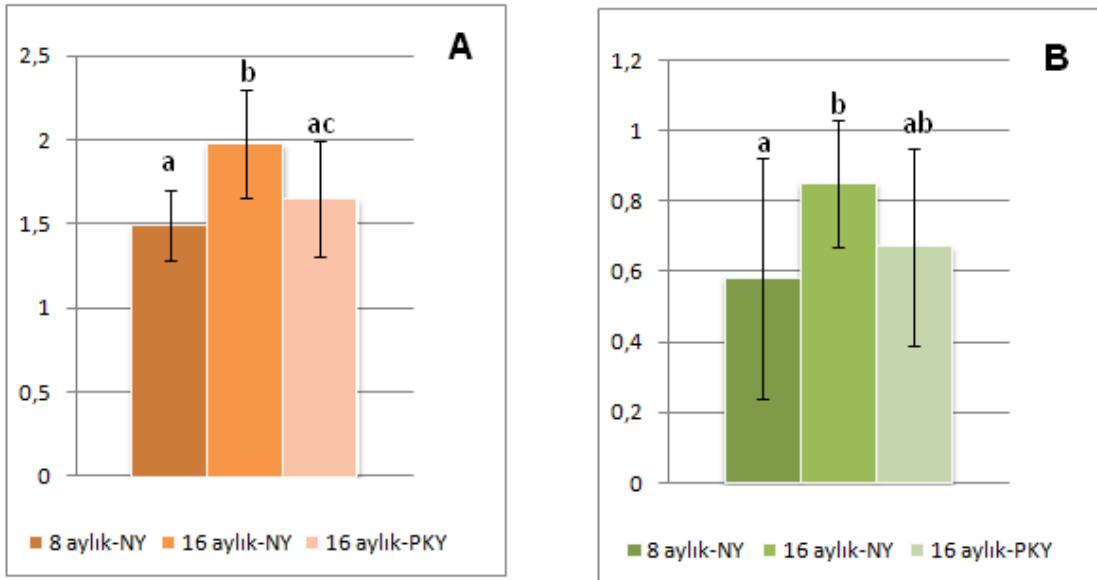
Tablo 4-2: Dört ay süreyle normal yem (NY) veya proteini kısıtlanmış yemle (PKY) beslenen sıçanların karaciğer homojenatında ve mitokondrisinde süperoksit salınımı (rölatif ışık birimi/mg protein), (Ortalama \pm SD).

	8 aylık-NY (n=15)	16 aylık-NY (n=15)	16 aylık-PKY (n=15)
Homojenat Süperoksit Salınımı	1,49 \pm 0,21 ^a	1,98 \pm 0,32 ^b	1,65 \pm 0,34 ^{ac}
Mitokondri Süperoksit Salınımı	0,58 \pm 0,18 ^a	0,85 \pm 0,34 ^b	0,67 \pm 0,28 ^{ab}

Farklı harfler anlamlılığı göstermektedir, p<0,05.

B- Karaciğer Mitokondrisinden Elde Edilen Bulgular (Tablo 4-2, Şekil 4-1)

- NY ile beslenen sıçanların karaciğerinde mitokondriyal süperoksit salınımı yaş ilerledikçe anlamlı olarak artmıştır. NY ile beslenen 8 ve 16 aylık sıçanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında 16 aylık sıçanların karaciğerinde mitokondriyal süperoksit salınımının 8 aylık sıçanlara göre %31 daha yüksek olduğu saptanmıştır.
- PKY ile beslenmenin aynı yaştaki sıçanlarda mitokondriyal süperoksit salınımını etkilemediği görülmüştür. NY ve PKY ile beslenen 16 aylık sıçanların mitokondriyal süperoksit salınımı birbirleriyle karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır.
- PKY ile beslenme, mitokondriyal süperoksit salınımında yaş ilerledikçe ortaya çıkan değişikliklerin önlenmesinde etkili olmuştur. PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar NY ile beslenen 8 aylık sıçanlarla karşılaştırıldığında, PKY ile beslenen 16 aylık sıçanların karaciğerinde mitokondriyal süperoksit salınımının %13 daha yüksek olduğu ancak bu farkın istatistiki olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.



Şekil 4-1: Yaşlanma sürecindeki sıçanlarda protein kısıtlamasının karaciğer homojenatında (A) ve karaciğer mitokondrisinde (B) süperoksit salınımına etkisi (Ortalama ± SD; her grup n=15). Farklı harfler anlamlılığı ifade eder (Kruskal-Wallis, Post-hoc Mann-Whitney U; p<0,05). NY: Normal yem; PKY: Proteini kısıtlanmış yem.

4.2. KARACİĞER HOMOJENATI VE MİTOKONDRİSİNDE PEROKSİT SALINIMI İLE İLGİLİ BULGULAR

A-Karaciğer Homojenatından Elde Edilen Bulgular (Tablo 4-3, Şekil 4-2)

- NY ile beslenen sıçanların karaciğer homojenatında peroksit salınımı yaş ilerledikçe anlamlı olarak artmıştır. NY ile beslenen 8 ve 16 aylık sıçanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında, 16 aylık sıçanların karaciğer homojenatında peroksit salınımının %116 daha yüksek olduğu saptanmıştır.
- PKY ile beslenmenin, aynı yaştaki sıçanlarda karaciğer homojenatında peroksit salınımını anlamlı olarak azalttığı görülmüştür. NY ve PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında PKY ile beslenen sıçanların karaciğer homojenatında peroksit salınımının %18 daha düşük olduğu saptanmıştır.
- PKY ile beslenmenin, yaş ilerledikçe karaciğer peroksit salınımında ortaya çıkan artışın önlenmesinde etkili olmadığı görülmüştür. PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar NY ile beslenen 8 aylık sıçanlarla karşılaştırıldığında, PKY ile beslenen 16 aylık sıçanların karaciğer homojenatında peroksit salınımının %44 daha yüksek olduğu ve bu farkın anlamlı olduğu saptanmıştır.

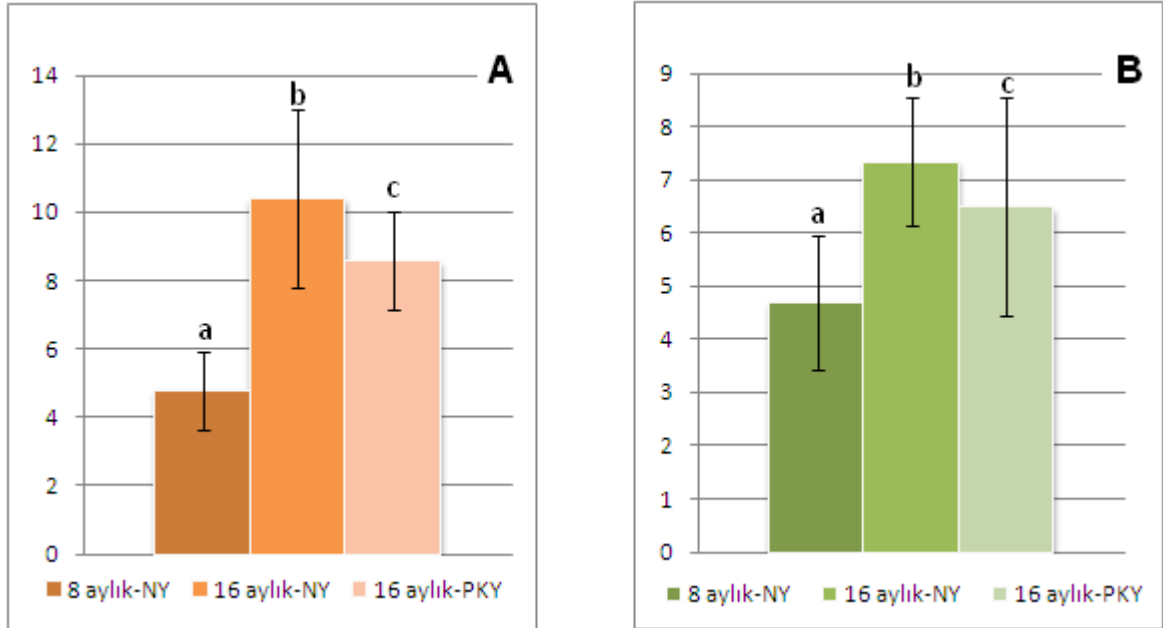
Tablo 4-3: Dört ay süreyle normal yem (NY) veya proteini kısıtlanmış yemle (PKY) beslenen sıçanların karaciğer homojenatında ve mitokondrisinde peroksit salınımı (rölatif ışık birimi/mg protein), (Ortalama ± SD).

	8 aylık-NY (n=15)	16 aylık-NY (n=15)	16 aylık-PKY (n=15)
Homojenat Peroksit Salınımı	4,80 ± 1,14 ^a	10,4 ± 2,58 ^b	8,56 ± 1,45 ^c
Mitokondri Peroksit Salınımı	4,69 ± 1,25 ^a	7,33 ± 1,21 ^b	6,47 ± 2,04 ^c

Farklı harfler anlamlılığı göstermektedir, p<0,05.

B- Karaciğer Mitokondrisinden Elde Edilen Bulgular (Tablo 4-3, Şekil 4-2)

- NY ile beslenen sıçanların mitokondriyal peroksit salınımı yaş ilerledikçe anlamlı olarak artmıştır. NY ile beslenen 8 ve 16 aylık sıçanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında 16 aylık sıçanların karaciğerinde mitokondriyal peroksit salınımının %56 daha yüksek olduğu saptanmıştır.
- PKY ile beslenmenin aynı yaştaki sıçanlarda mitokondriyal peroksit salınımını anlamlı olarak azalttığı görülmüştür. NY ve PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında, PKY ile beslenen sıçanların karaciğerinde mitokondriyal peroksit salınımının %12 daha düşük olduğu saptanmıştır.
- PKY ile beslenme mitokondriyal peroksit salınımında yaş ilerledikçe ortaya çıkan artışın önlenmesinde etkili olmamıştır. PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar NY ile beslenen 8 aylık sıçanlarla karşılaştırıldığında PKY ile beslenen 16 aylık sıçanların karaciğerinde mitokondriyal peroksit salınımının %28 daha yüksek olduğu ve bu farkın anlamlı olduğu saptanmıştır.



Şekil 4-2: Yaşlanma sürecindeki sıçanlarda protein kısıtlamasının karaciğer homojenatında (A) ve karaciğer mitokondrisinde (B) peroksit salımına etkisi. (Ortalama \pm SD; her grup n=15) Farklı harfler anlamlılığı ifade eder (Kruskal-Wallis, Post-hoc Mann-Whitney U; $p<0,05$) NY: Normal yem; PKY: Proteini kısıtlanmış yem.

4.3. KARACİĞER HOMOJENATI VE MİTOKONDRİDE PROTEİN KARBONİL DÜZEYİ İLE İLGİLİ BULGULAR

A- Karaciğer Homojenatından Elde Edilen Bulgular (Tablo 4-4, Şekil 4-3)

- NY ile beslenen sıçanların karaciğer protein karbonil düzeyleri yaş ilerledikçe anlamlı olarak artmıştır. NY ile beslenen 8 ve 16 aylık sıçanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında, 16 aylık sıçanların karaciğer homojenatında protein karbonil düzeylerinin %95 daha yüksek olduğu saptanmıştır.
- PKY ile beslenme aynı yaştaki sıçanlarda karaciğer protein karbonil düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır. NY ve PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında, PKY ile beslenen sıçanların karaciğer homojenatında protein karbonil düzeylerinin %34 daha düşük olduğu saptanmıştır.
- PKY ile beslenme, karaciğer protein karbonil düzeyinde yaş ilerledikçe ortaya çıkan artışın önlenmesinde etkili olmuştur. PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar, NY ile beslenen 8 aylık sıçanlarla karşılaştırıldığında, PKY ile beslenen sıçanların karaciğer homojenatında protein karbonil düzeylerinin %21,6 daha yüksek olduğu ancak bu farkın istatistiki olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

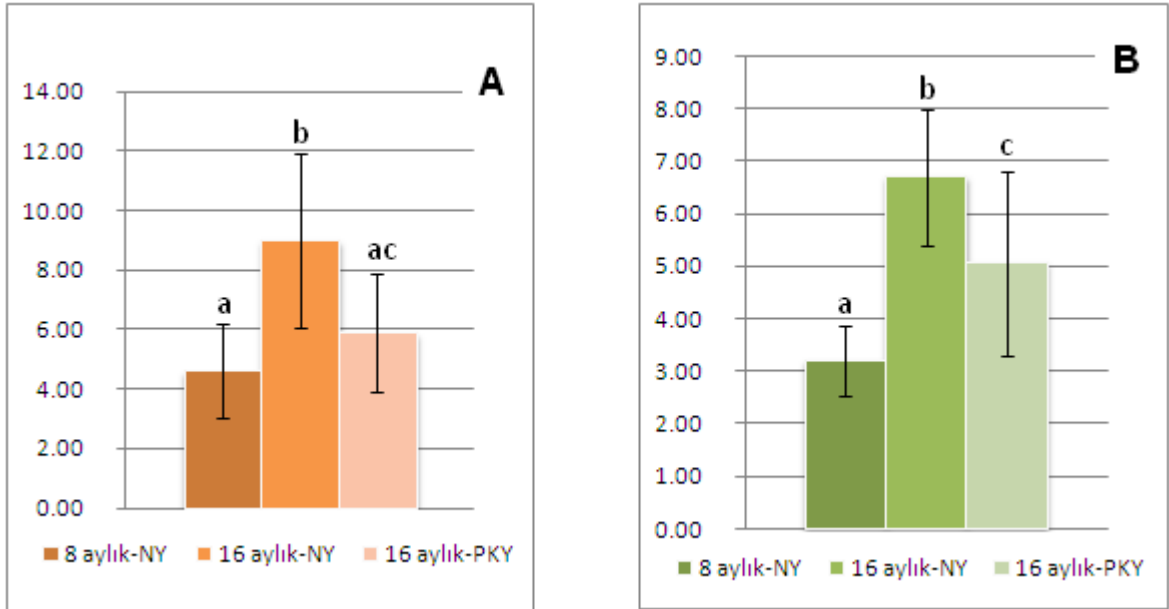
Tablo 4-4: Dört ay süreyle normal yem (NY) veya proteini kısıtlanmış yemle (PKY) beslenen sıçanların karaciğer homojenatında ve mitokondrisinde protein karbonil düzeyleri (nmol/mg protein), (Ortalama ± SD).

	8 aylık-NY (n=15)	16 aylık-NY (n=15)	16 aylık-PKY (n=15)
Homojenat Protein Karbonil	4,60 ± 1,60 ^a	8,98 ± 2,97 ^b	5,87 ± 1,99 ^{ac}
Mitokondri Protein Karbonil	3,2 ± 0,68 ^a	6,6 ± 1,30 ^b	5,05 ± 1,76 ^c

Farklı harfler anlamlılığı göstermektedir, p<0,05.

B- Karaciğer Mitokondrisinden Elde Edilen Bulgular (Tablo 4-4, Şekil 4-3)

- NY ile beslenen sıçanların mitokondriyal protein karbonil düzeyleri yaş ilerledikçe anlamlı olarak artmıştır. NY ile beslenen 8 ve 16 aylık sıçanlar karşılaştırıldığında, 16 aylık sıçanların karaciğerinde mitokondriyal protein karbonil düzeylerinin %109 daha yüksek olduğu saptanmıştır.
- PKY ile beslenmenin aynı yaştaki sıçanlarda karaciğer protein karbonil düzeylerini anlamlı olarak azalttığı görülmüştür. NY ve PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında PKY ile beslenen sıçanların karaciğerinde mitokondriyal protein karbonil düzeylerinin %25 daha düşük olduğu saptanmıştır.
- PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar, NY ile beslenen 8 aylık sıçanlarla karşılaştırıldığında PKY ile beslenen 16 aylık sıçanların karaciğerinde mitokondriyal protein karbonil düzeylerinin %36 daha yüksek olduğu ve bu farkın anlamlı olduğu saptanmıştır. PKY ile beslenme mitokondriyal protein karbonil düzeyinde yaş ilerledikçe ortaya çıkan artışın önlenmesinde etkili olmamıştır.



Şekil 4-3: Yaşlanma sürecindeki sıçanlarda protein kısıtlamasının karaciğer homojenatında (A) ve karaciğer mitokondrisinde (B) protein karbonil düzeylerine etkisi. (Ortalama ± SD; her grup n=15) Farklı harfler anlamlılığı ifade eder (Kruskal-Wallis, Post-hoc Mann-Whitney U; p<0,05) NY: Normal yem; PKY: Proteini kısıtlı yem

4.4. KARACİĞERDE GENOMİK VE MİTOKONDRIYAL DNA 8-OHdG DÜZEYLERİ İLE İLGİLİ BULGULAR

A- gDNA'dan Elde Edilen Bulgular (Tablo 4-5, Şekil 4-4)

- NY ile beslenen sıçanların gDNA 8-OHdG içeriğinin yaş ilerledikçe değişmediği görülmüştür. NY ile beslenen 8 ve 16 aylık sıçanlar birbiriyle karşılaştırıldığında, 16 aylık sıçanların gDNA 8-OHdG düzeylerinin %21 daha düşük olduğu ancak bu farkın anlamlı olmadığı saptanmıştır.
- NY ve PKY ile beslenen 16 aylık sıçanların gDNA 8-OHdG düzeyleri birbirleriyle karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır. PKY ile beslenme aynı yaştaki sıçanlarda gDNA'nın 8-OHdG düzeyinin değiştirilmesinde etkili olmamıştır.
- PKY ile beslenmenin yaşlanma sürecinde gDNA 8-OHdG düzeyleri etkilemediği görülmüştür. PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar, NY ile beslenen 8 aylık sıçanlarla karşılaştırıldığında PKY ile beslenen 16 aylık sıçanların gDNA 8-OHdG düzeylerinin %31 daha düşük olduğu ancak bu farkın istatistiki olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

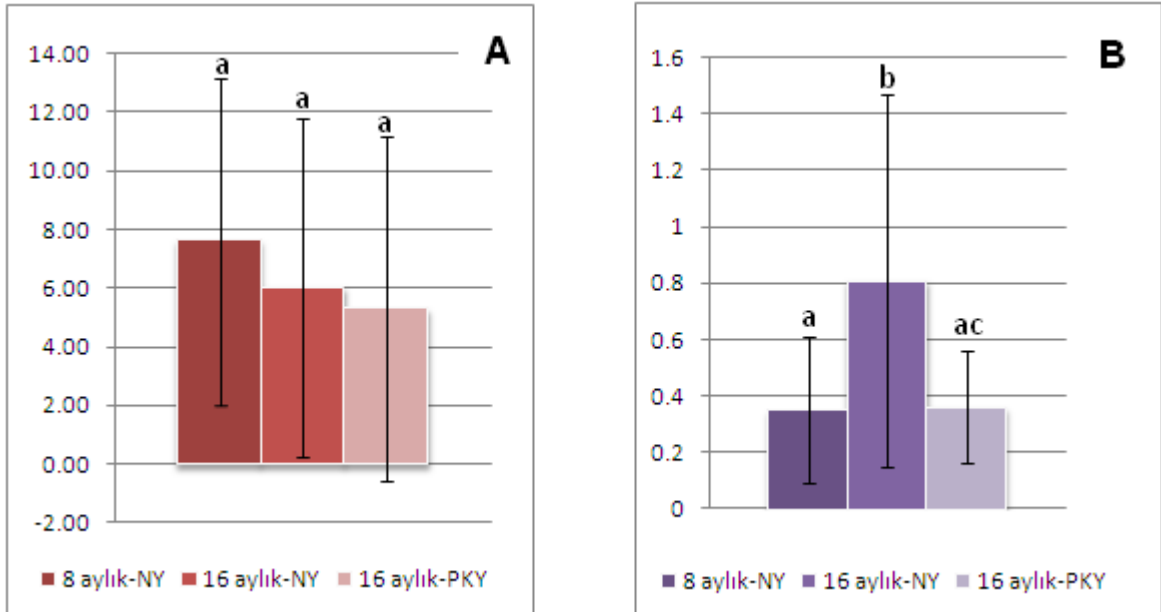
Tablo 4-5: Dört ay süreyle normal yem (NY) veya proteini kısıtlanmış yemle (PKY) beslenen sıçanların karaciğerinde gDNA ve mtDNA 8-OHdG düzeyleri (ng/mL), (Ortalama ± SD)

	8 aylık-NY (n=15)	16 aylık-NY (n=15)	16 aylık-PKY (n=15)
gDNA 8-OHdG	7,61 ± 5,48 ^a	6,02 ± 5,77 ^a	5,24 ± 5,84 ^a
mtDNA 8-OHdG	0,34 ± 0,26 ^a	0,80 ± 0,65 ^b	0,35 ± 0,25 ^{ac}

Farklı harfler anlamlılığı göstermektedir, p<0,05.

B- mtDNA'dan Elde Edilen Bulgular (Tablo 4-5, Şekil 4-4)

- NY ile beslenen sıçanların mtDNA 8-OHdG düzeyi yaş ilerledikçe anlamlı olarak artmıştır. NY ile beslenen 8 ve 16 aylık sıçanlar birbiriyle karşılaştırıldığında 16 aylık sıçanların mtDNA 8-OHdG düzeylerinin %54 daha yüksek olduğu saptanmıştır.
- PKY ile beslenme aynı yaştaki sıçanlarda mtDNA 8-OHdG düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır. NY ve PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar birbiriyle karşılaştırıldığında, PKY ile beslenen sıçanların mtDNA 8-OHdG düzeylerinin %56 daha düşük olduğu saptanmıştır.
- PKY ile beslenmenin mtDNA'nın 8-OHdG düzeylerinde yaş ilerledikçe ortaya çıkan artışın önlenmesinde etkili olmuştur. PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar NY ile beslenen 8 aylık sıçanlarla karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır.



Şekil 4-4: Yaşlanma sürecindeki sıçanlarda protein kısıtlamasının karaciğerde gDNA (A), mtDNA (B) 8-OHdG düzeylerine etkisi. (Ortalama ± SD; her grup n=15) Farklı harfler anlamlılığı ifade eder (Kruskal-Wallis, Post-hoc Mann-Whitney U; p<0,05) NY: Normal yem; PKY: Proteini kısıtlı yem

4.5. KARACİĞER TELOMERAZ AKTİVİTESİ VE TELOMER UZUNLUĞU İLE İLGİLİ BULGULAR

A- Telomeraz Aktivitesi (Tablo 4-6, Şekil 4-5)

- NY ile beslenen 8 ve 16 aylık sıçanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında 16 aylık sıçanların telomeraz aktivitesinin 8 aylık sıçanlara göre %36 daha düşük olduğu ancak bu farkın istatistiki olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.
- NY ve PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında PKY ile beslenen sıçanların telomeraz aktivitesinin NY ile beslenenlere göre %17 daha yüksek olduğu ancak bu farkın istatistiki olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.
- PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar NY ile beslenen 8 aylık sıçanlarla karşılaştırıldığında PKY ile beslenen 16 aylık sıçanların telomeraz aktivitesinin NY ile beslenen 8 aylık sıçanlara göre %22 daha düşük olduğu ancak bu farkın istatistiki olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.

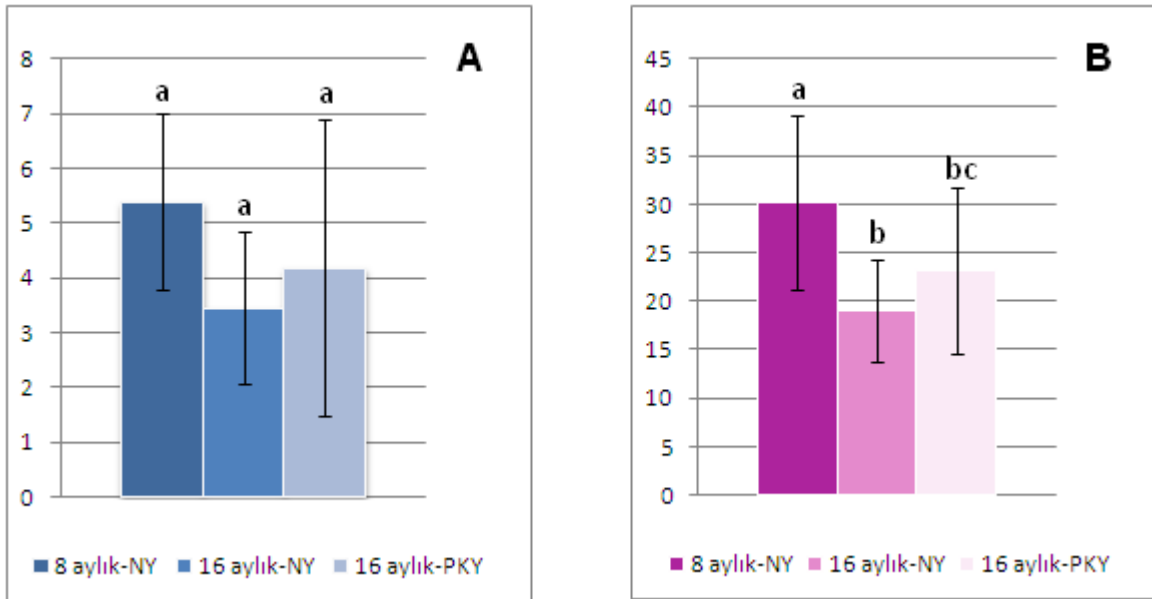
Tablo 4-6: Dört ay süreyle normal yem (NY) veya proteini kısıtlanmış yemle (PKY) beslenen sıçanların karaciğerinde telomeraz aktivitesi (U) ve telomer uzunlukları (kb), (Ortalama ± SD).

	8 aylık-NY (n=15)	16 aylık-NY (n=15)	16 aylık-PKY (n=15)
Telomeraz Aktivitesi	5,38 ± 1,71 ^a	3,46 ± 1,4 ^a	4,18 ± 2,7 ^a
Telomer Boyu	30,15 ± 9,13 ^a	19,1 ± 5,57 ^b	23,12 ± 8,18 ^{bc}

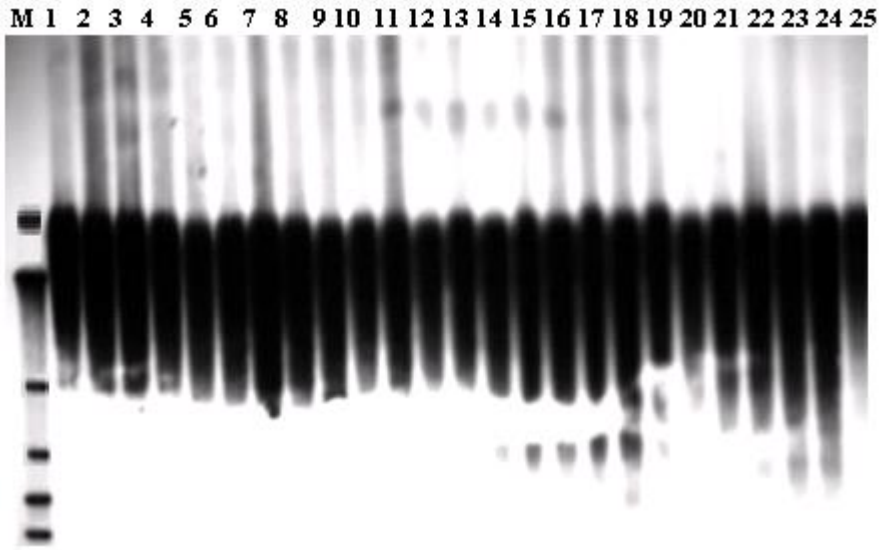
Farklı harfler anlamlılığı göstermektedir, p<0,05.

B- Telomer Uzunluğu (Tablo 4-6, Şekil 4-5, Şekil 4-6)

- NY beslenen sıçanların telomer boyunun yaş ilerledikçe anlamlı olarak kısaldığı görülmüştür. NY ile beslenen 8 ve 16 aylık sıçanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında 16 aylık sıçanların telomer boyunun %37 daha kısa olduğu saptanmıştır.
- PKY ile beslenmenin aynı yaştaki sıçanlarda telomer uzunluğunun korunmasında etkili olmadığı görülmüştür. NY ve PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar birbirleriyle karşılaştırıldığında PKY ile beslenen sıçanların telomer boyunun NY ile beslenenlere göre %17 daha uzun olduğu ancak bu farkın istatistiki olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır.
- PKY ile beslenme yaş ilerledikçe telomer boyunda meydana gelen kısalmanın önlenmesinde etkili olmamıştır. PKY ile beslenen 16 aylık sıçanlar NY ile beslenen 8 aylık sıçanlarla karşılaştırıldığında, PKY ile beslenen 16 aylık sıçanların telomer boyunun %23 daha kısa olduğu ve bu farkın anlamlı olduğu saptanmıştır.



Şekil 4-5: Yaşlanma sürecindeki sıçanlarda protein kısıtlamasının karaciğerde telomeraz aktivitesi (A), telomer uzunluğuna (B) etkisi. (Ortalama ± SD; her grup n=15) Farklı harfler anlamlılığı ifade eder (Kruskal-Wallis, Post-hoc Mann-Whitney U; p<0,05) NY: Normal yem; PKY: Proteini kısıtlı yem



Şekil 4-6: NY ve PKY ile beslenen sıçanların telomer uzunluklarının Southern Blot yöntemiyle elde edilen görüntüleri;

1-8; 8 Aylık-NY, 9-14; 16 Aylık-NY, 15-25; 16 Aylık-PKY ile beslenen sıçanlara aittir. NY: Normal yem, PKY: Proteini kısıtlı yem

5. TARTIŞMA

Memeliler dahil birçok canlı türünde yaş ilerledikçe organizmada molekül, hücre, doku ve organ sistemleri düzeyinde lipit, protein ve DNA hasarının ortaya çıktığı ve yaşlanmanın bu hasara bağlı gelişen genetik instabilite ile ilişkili olduğu saptanmıştır (9). Mevcut bilgiler, yaş ilerledikçe ortaya çıkan ve giderek biriken bu moleküler hasarın temel belirleyici etkeninin mitokondriyal ROS üretim hızının artması ve buna bağlı gelişen oksidatif stres olduğunu göstermektedir (9,15). Yaşlanmanın önlenmesi ya da yavaşlatılmasına yönelik olarak yapılan deneysel uygulamalar arasında besin kısıtlamasının laboratuvar kemirgenleri dahil birçok hayvan türünde ve insanlarda yaşlanmayı yavaşlatan ve maksimum yaşam süresini uzatan en güçlü uygulama olduğu görülmüştür (25,28,141). Besin kısıtlaması uygulanan çalışmalar incelendiğinde maksimum yaşam süresinin uzatılmasında en başarılı uygulamanın -esansiyel besinler yeterli olmak koşulu ile- günlük alınan besin miktarının azaltılması, yani kalori kısıtlaması olduğu saptanmıştır (25,28,142). Günlük alınan kalori miktarının %40 oranında azaltılmasının birçok canlı türünde maksimum yaşam süresini yaklaşık %40 uzattığı gösterilmiştir (28,125). Yaşam süresinin uzatılmasında kalori kısıtlamasıyla elde edilen bu sonuçların alınan besinin içeriğinden çok, günlük alınan kalori miktarı ile ilişkili olduğu konusunda bir görüş birliği olmasına rağmen, son yıllarda ortaya atılan yeni yaklaşımlarla bu durum değişmeye başlamıştır. Temel besin öğelerinin günlük oranının değişmesinin de maksimum yaşam süresinde etkin olabileceği ileri sürülmüştür (28,31,32). Gerçekten de protein kısıtlamasının kalori kısıtlamasıyla elde edilen etkinin %50'sinden sorumlu olduğu, %40 protein kısıtlamasının BALB/c ve DBA/2f cinsi fareler ve Fisher 344 ve Wistar cinsi sıçanlarda yaşam süresini yaklaşık %20 uzattığı gösterilmiştir (28,131,137). Ayrıca protein kısıtlamasının, kalori kısıtlamasında olduğu gibi, maksimum yaşam süresini uzatmasının yanı sıra puberte gecikmesi, büyümede ve metabolik hızda yavaşlama, hücrel immünitede artma ve preneoplastik lezyon oluşumunda azalma gibi etkilere de sahip olduğu gösterilmiştir (37). Bazı araştırmacılar protein kısıtlamasının yaşlanmayı yavaşlatıcı etkilerinden metyoninin sorumlu olduğunu ve protein kısıtlaması yapılmaksızın metyonin kısıtlaması uygulamasının da aynı etkileri sağlayacağını ileri sürmektedir (38-40). Henüz kısıtlı sayıda olan çalışmalarda %40-80 oranında metyonin kısıtlamasının mitokondriyal ROS üretimini, mitokondriden serbest elektron kaçışını, oksidatif mtDNA hasarını azalttığı ve maksimum yaşam

süresini uzattığı bildirilmiştir (41). Protein kısıtlamasının yaşlanma üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda günlük protein miktarı farklı oranlarda (%40-85 arasında) kısıtlanmış ve kısıtlama oranı ile maksimum yaşam süresi arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir (143-148). Ancak alınan protein miktarının %42'den %18'e indirilmesinin erkek sıçanların olgunlaşmasını yavaşlattığı ve yaşam süresini olumsuz yönde etkilediği saptanmış ve %40 protein kısıtlamasının yaşam süresinin uzatılması, kompleks I içeriğinin, mitokondriyal ROS üretiminin, oksidatif protein, lipid ve DNA hasarının azaltılması için yeterli olduğu bildirilmiştir (148).

Diğer taraftan besin kısıtlaması uygulanan araştırmalarda uygulama süresinin de önemli olduğu bildirilmektedir (149). Gredilla ve ark.'ları (150) farklı sürelerde besin kısıtlaması uygulanan sıçanlarda mitokondriyal ROS üretimi ve oksidatif hasarın incelenebilmesi için karaciğerde 6-7 haftalık uygulamanın yeterli olduğunu, kalp dokusunda aynı etkilerin ortaya konulabilmesi için bu sürenin en az 4 ay olması gerektiğini bildirmiştir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında oluşturduğumuz deneysel çalışma modelinde 4 ve 12 aylık Wistar Albino erkek sıçanlar normal yemle beslenirken 12 aylık bir grup sıçan da aynı süre boyunca metyonin hariç proteini %40 kısıtlanmış yemle beslenmiştir. Yaşlanma sürecinde protein kısıtlamasının karaciğer dokusunda ROS üretimi ile oksidatif protein ve DNA hasarına etkilerini incelemek üzere besin kısıtlaması 4 ay süreyle uygulanmıştır. NY ile beslenen sıçanların hem karaciğer homojenatında hem de mitokondrisinde süperoksit ve peroksit salınımı ile protein karbonil düzeylerinin yaş ilerledikçe anlamlı olarak arttığı görülmüştür.

Çalışmamızda diğer yaşlanma çalışmaları ile uyumlu olarak NY ile beslenen sıçanların mtDNA'da 8-OHdG düzeylerinin anlamlı olarak arttığı saptanmıştır (127,128,149,151). gDNA 8-OHdG düzeylerinde ise yaş ilerledikçe ortaya çıkan bir değişiklik saptanmamıştır (127). Bu bulgu bazı çalışmalarla uyumlu iken, gDNA 8-OHdG düzeylerinin arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (128,149). Protein kısıtlamasının ölçülen parametrelere etkilerini incelemek amacıyla, PKY ile ve NY ile beslenen aynı yaştaki sıçanları birbiriyle karşılaştırdığımızda; PKY ile beslenen sıçanların karaciğer homojenatında süperoksit ve peroksit salınımı ile protein karbonil düzeyleri, mitokondride ise peroksit salınımı ve protein karbonil düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Protein kısıtlamasının aynı yaştaki sıçanların gDNA'da 8-OHdG düzeylerini etkilemediği, mtDNA'da ise anlamlı bir azalma sağladığı görülmüştür. Elde

ettiğimiz sonuçlar protein kısıtlaması uygulanan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir (130,131,152). Sanz ve ark.'ları protein kısıtlamasının etkilerini inceledikleri çalışmalarında Wistar cinsi sıçanları 7 hafta süreyle proteini %40, toplam kalorisi %8,5 kısıtlanmış yemle beslemişler. Karaciğer mitokondrisinde hidrojen peroksit düzeylerinin, serbest elektron kaçışının ve mtDNA 8-OHdG düzeyleri ile gDNA 8-OHdG düzeylerinin anlamlı olarak azaldığını saptayarak, besinle alınan protein miktarının azaltılmasının karaciğerde endojen oksidatif stresin önleminde etkili olabileceği sonucuna varmışlardır (137). Youngman ve ark.'ları (131) da 6 ve 12 hafta süreyle %50 veya %75 protein kısıtlaması uygulanan üç haftalık Fischer 344 sıçanların karaciğerinde protein karbonil düzeylerinin anlamlı olarak azaldığını ve bu uygulamanın yaşlanmada da etkili olabileceğini bildirmiştir. Yedi hafta süreyle %40 protein kısıtlaması uygulanan bir başka çalışmada ise, protein kısıtlamasının Wistar cinsi erkek sıçanların karaciğer mitokondrisinde kompleks I ve II içeriğini azalttığı, oksidatif protein hasarını önlediği ve hücre membranlarını oksidasyondan koruduğu gösterilmiştir (152). Bu çalışmaların hemen hepsi 6-7 hafta süre ile protein kısıtlaması yapılan ve yapılmayan sıçanların karşılaştırılmasına dayanan çalışmalardır. Diğer taraftan, protein kısıtlamasının yaşlanma sürecine etkilerini inceleyen çalışmalarda da daha çok maksimum ve ortalama yaşam süresine etkileri incelenmiş, ancak oksidan parametreler ve oksidatif hasar incelenmemiştir. Çalışmamızda ise, yaşlanma sürecindeki sıçanlara (12 aylık sıçan) 4 ay süreyle proteini kısıtlanmış yem uygulamasının oksidan parametreler ve oksidatif hasara etkisi araştırılmıştır.

Sonuçlarımıza göre, PKY ile beslenme yaş ilerledikçe karaciğer homojenatında ve mitokondrisinde ortaya çıkan süperoksit artışını önlemekte etkili olurken, peroksit düzeylerine bir etkisi olmadığı görülmüştür. PKY ile beslenme yaşlanma sürecindeki sıçanların sadece karaciğer homojenatında protein karbonil oluşumunu önleyici bir etki göstermiş, ancak aynı etki mitokondride saptanamamıştır. DNA hasarına etkisinde ise tam tersi olmuş, mtDNA'da yaş ilerledikçe ortaya çıkan 8-OHdG artışını önlerken, gDNA'da böyle bir etki sağlamamıştır.

Protein kısıtlamasının oksidatif strese etkilerini inceleyen kısıtlı sayıda çalışmanın bir kısmında protein kısıtlamasının oksidatif stresi önlemedeki olumlu etkilerinden metyoninin sorumlu olabileceği görüşünden yola çıkılarak deney hayvanlarına diğer besin öğelerinin miktarı değiştirilmeden metyonin kısıtlaması uygulanmıştır (39-41,153). Metyonini %40 ve %80 oranında kısıtlanmış yemle 7 hafta

süreyile beslenen Wistar cinsi sıçanların karaciğer dokusunda oksidatif protein ve lipit hasarının, serbest elektron kaçışının ve mtDNA hasarının normal yemle beslenen kontrollere göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (41). Benzer şekilde yapılan bir başka çalışmada ise 7 hafta süreyle metyonini %40 kısıtlanmış yemle beslenmenin Wistar cinsi sıçanların, karaciğer dokusunun yanı sıra kalp dokusunda da oksidatif protein ve mtDNA hasarı ile peroksit üretimi ve serbest elektron kaçışını anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır (39,40). Metyonin kısıtlaması çalışmalarının sonucunda genellikle, metyonin kısıtlamasının kalori kısıtlamasında olduğu gibi solunum zinciri elemanlarının radikal oluşturma potansiyellerini azaltarak mtDNA ve proteinleri oksidatif hasardan koruduğu gösterilmiştir (39-41,153). Bu etkileri nedeniyle yaş ilerledikçe artan oksidatif hasardan metyoninin sorumlu olabileceği, yaşlanmayı yavaşlatmak için kalori ya da protein kısıtlaması yerine metyonin kısıtlaması yapılmasının yeterli olduğu ileri sürülmüştür (153). Literatürde, Caro ve ark.'ları (154,155) tarafından gerçekleştirilen ve çalışmamızda yapılan uygulamaya benzer şekilde metyonin kısıtlaması yapılmadan %40 protein kısıtlaması uygulanan yalnızca iki tane çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, 7 hafta süreyle metyonin dışındaki tüm aminoasitleri %40 kısıtlanmış yemle beslenmenin yedi haftalık Wistar cinsi sıçanların karaciğer mitokondrisinde ROS oluşumu ve oksidatif DNA hasarının önlenmesinde olumlu bir etki sağlamadığı, oksidatif protein ve lipit hasarını ise azalttığı saptanmıştır (154,155). Bu araştırmacılar kalori kısıtlamasının yaşlanmayı yavaşlatıcı etkilerinin ROS üretimi ve mtDNA hasarının önlenmesi ile ilişkili olduğunu ve bu durumun kalori kısıtlaması sonucu diyetle azalan metyoninden kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir (154,155). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, bu çalışmaların sonuçlarının bir kısmı ile uyumludur; biz de çalışmamızda metyonin hariç, proteini %40 kısıtlanmış yemle beslenmenin karaciğer mitokondrisinde protein karbonil düzeylerini anlamlı olarak azalttığını, süperoksit salınımını ise etkilemediğini saptadık. Peroksit salınımı ve mtDNA 8-OHdG düzeyleri ile ilgili sonuçlarımız ise Caro ve ark.'larının sonuçlarını desteklememektedir. Bu durum çalışmalarda kullanılan sıçanların yaşı ve yem uygulama süreleri arasındaki farktan kaynaklanabilir. Caro ve ark.'ları metyonin hariç, proteini %40 kısıtlanmış yemi yedi haftalık sıçanlara 7 hafta süreyle uygularken, biz çalışmamızda aynı özellikteki yemi 12 aylık sıçanlara 4 ay süre ile uyguladık.

Bilindiği gibi, mitotik hücreler belirli sayıda hücre bölünmesi yaptıktan sonra güçlü bir telomeraz uyarısına maruz kalmadıkça büyüme ve çoğalma yeteneklerini

kaybederek yaşlanırlar. Telomer boyunun kısalması genomik instabiliteye yol açarak kromozom uçlarının füzyonuna, hücrenin mitoz ve yenilenme kapasitesinde azalmaya neden olur. Telomeraz, telomerlerde ortaya çıkan bu durumun önlenmesi ve telomer boyunun korunmasında en önemli belirleyicidir. Bir başka ifadeyle, telomer boyunun kısalması belli bir yaşam süresine sahip canlılarda saatin ilerlemesini gösteriyorsa, telomeraz aktivitesi bu ilerlemeyi yavaşlatan ya da geri döndüren etkidir. Telomer boyundaki kısaltmaların kardiyovasküler hastalıklar, diyabet gibi birçok hastalık, yaşlanma ve mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (156,157). Diğer taraftan, DNA'nın telomerik bölgesinin oksidatif hasara diğer DNA bölgelerinden daha duyarlı olduğu, oksidatif stresin telomeraz aktivitesi ve telomer uzunluğunu negatif olarak etkilediği *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (44-46). Kültür ortamına antioksidanların eklenmesinin telomeraz aktivitesinin daha uzun süre devam etmesini sağladığı ve telomer kısaltmasını yavaşlattığı bildirilmiştir (46). Besin kısıtlamasının telomeraz aktivitesi ve telomer boyuna etkilerini inceleyen bir çalışma ise henüz mevcut değildir. Metyonin hariç %40 protein kısıtlamasının telomeraz aktivitesi ve telomer boyuna etkilerini inceleyen bu ilk çalışmada, protein kısıtlaması uygulanan sıçanların telomeraz aktiviteleri ve telomer uzunluklarının normal yemle beslenen akranlarından farklı olmadığı saptanmıştır. Telomeraz aktivitesi ve telomer boyunda yaş ilerledikçe ortaya çıkan azalmanın önlenmesinde metyonin hariç %40 protein kısıtlaması olumlu bir etkide bulunmamıştır.

Elde ettiğimiz sonuçlar, metyonin hariç proteini kısıtlanmış diyetin yaşlanma sürecindeki sıçanların karaciğerinde, özellikle mitokondri fraksiyonunda, protein ve DNA hasarının önlenmesinde olumlu etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Reaktif oksijen bileşiklerinin üretiminin ve oksidan hasarın önlenmesinde, metyonin dışındaki diğer amino asitlerin besinle alınan miktarlarının azaltılmasının da önemli katkısı olabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1) Rattan SI. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. *Free Radic Res* 2006; 40: 1230–1238.
- 2) Medavar PB. *An unsolved problem of biology*. London; H.K. Lewis & Co; 1952.
- 3) Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Gerontology* 1956; 11: 298–300.
- 4) Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Ger Society* 1972; 20: 145–57.
- 5) Hayflick L, Moorhead PS. The Serial Cultivation of Human Telomerase Activity Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585–621.
- 6) Dilman V. Data regarding the origin of climacteric and the role of age-associated “perestroika” in the elevation of blood pressure, blood cholesterol levels, and body weight. Master’s Thesis, Leningrad, 1954.
- 7) Berneburg M, Kamenisch Y, Krutmann J. Repair of mitochondrial DNA in aging and carcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci* 2006; 5: 190–198.
- 8) Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo, AY, Sullivan, R, Jobling WA, Morrow JD, Remmen HV, Sevidy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leewenburgh C, Prolla TA. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress and apoptosis in mammalian aging. *Science* 2005; 309: 481–484.
- 9) Viña J, Borrás C, Miquel J. Theories of ageing. *IUBMB Life* 2007; 4: 249–254.
- 10) Arnal JF, Clamens S, Pechet C, Negre-Salvayre A, Allera C, Girolami JP, Salvayre R, Bayard F. Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 4108–4113.

- 11) King A, Gottlieb E, Brooks DG, Murphy MP, Dunaief JL. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate if blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol* 2004; 79: 470–475.
- 12) Krasnovsky AA, Drozdova NN, Ivanov AV, Ambartsumian RV. Activation of molecular oxygen by infrared laser radiation in pigment-free aerobic systems. *Biochemistry* 2003; 68: 963–966.
- 13) Tirlapur UK, Konig K, Peuckert C, Krieg R, Halbhuber KJ. Femtosecond near-infrared laser pulses elicit generation of reactive oxygen species in mammalian cells leading to apoptosis-like death. *Exp Cell Res* 2001; 263: 88–97.
- 14) Uysal M. Serbest radikaller ve oksidatif stres. *Biyokimya. İstanbul; Nobel Tıp Kitapevleri*; 2010.
- 15) Burçak G, Andican G. Oxidative DNA damage and aging. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35: 159–169.
- 16) Atlı K, Bozcuk A. N Telomer ve hücrel yaşlanma *Turkish Journal of Geriatrics* 2002; 5: 111–114.
- 17) Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of the rats. *FASEB J* 1996; 10: 1532–1538.
- 18) Cini M, Moretti A. Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. *Neurobiol Aging* 1995; 16: 53–57.
- 19) Sohal RS, Agarwal S, Sohal BH. Oxidative stress and aging in the Mongolian Gerbil. *Mech Ageing Dev* 1995; 81: 15–25.
- 20) Cai Q, Tian L, Wei H. Age dependent increase of indigenous DNA adducts in rat brain is associated with lipid peroxidation product. *Exp Gerontol* 1996; 31: 373–385.
- 21) Miquel J, Economos C, Fleming J, Johnson JE. Mitochondrial role in cell ageing. *Exp Gerontol* 1980; 15: 575–591.

- 22) Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Rad Biol & Med* 2000; 29: 222–230.
- 23) Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutations and disease. *FASEB J* 2003; 17: 1195–1214.
- 24) Wallace DC. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Scientific American* 1997; 8: 40–47.
- 25) Barja G. Endogenous oxidative stress: Relationship to aging, longevity and caloric restriction. *Ageing Res Rev* 2002; 1: 397–411.
- 26) Page MM, Robb EL, Salway KD, Stuart JA. Mitochondrial redox metabolism: aging, longevity and dietary effects. *Mech Ageing Dev* 2010; 131: 242–252.
- 27) Weindruch R. Caloric restriction, gene expression, and aging. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2003;17: 58–59.
- 28) Pamplona R, Barja G. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: The protein and methionine connection. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757: 496–508.
- 29) Barouki R. Ageing free radicals and cellular stress. *Medicine Science* 2006; 22: 266–272.
- 30) Lee DW, Yu BP. Modulation of free radicals and superoxide dismutase by age and dietary restriction. *Aging* 1990; 2: 357–362.
- 31) Singh P.N, Sabaté J, Fraser GE. Does low meat consumption increase life expectancy in humans? *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 526–532.
- 32) Mair W, Piper MDW, Partridge L. Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *PLOS Biol* 2005; 3: 1305–1311.
- 33) Shimokawa I, Higami Y, Yu BP, Masoro EJ, Takeda T. Influence of dietary components on occurrence of and mortality due to neoplasms in male F344 rats. *Aging Clin Exp Res* 1996; 8: 254–262.

- 34) Iwasaki K, Gleiser CA, Masoro EJ, McMahan CA, Seo EJ, Yu BP. Influence of the restriction of individual dietary components on longevity and age-related disease of Fisher rats: the fat component and the mineral component. *J Gerontol* 1988; 43: 13–21.
- 35) Ross MH. Nutrition and longevity in experimental animals. M. Winick (Ed.), *Nutrition and Aging*, Wiley, New York, 1976, 43–57.
- 36) Khorakova M, Deil Z, Khausman D, Matsek K. Effect of carbohydrate enriched diet and subsequent food restriction on life prolongation in Fisher 344 male rats. *Fiziol Z* 1990; 36: 16–21.
- 37) Sanz A, Caro P, Barja G. Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J Bioenerg Biomembr* 2004; 36: 545–552.
- 38) Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R, Orentreich N. Nutritional control of aging. *Exp Gerontol* 2003; 38: 47–52.
- 39) Richie Jr JP, Komninou D, Leutzinger Y, Kleinman W, Orentreich N, Malloy V, Zimmerman JA. Tissue glutathione and cysteine levels in methionine-restricted rats. *Nutrition* 2004; 20: 800–805.
- 40) Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R. Methionine deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 2005; 4: 119–125.
- 41) Caro P, Gómez J, López-Torres M, Sánchez I, Naudí A, Jove M, Pamplona R, Barja G. Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver. *Biogerontology* 2008; 9: 183–196.
- 42) Dubrana K, Perrod S and Gasser S M. Turning telomeres off and on. *Curr Opin Cell Biol.* 2001 Jun; 13: 281–289.

- 43) Riethman HC, Xiang Z, Paul S, Morse E, Hu XL, Flint J, Chi HC, Grady D L and Moyzis RK. Integration of telomere sequences with the draft human genome sequence. *Nature* 2001 15; 409: 948–951.
- 44) Von Zglinicki T, Saretzki G, Döcke W, Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* 1995; 220: 186–193.
- 45) Vaziri H, West MD, Allsopp RC, Davison TS, Wu YS, Arrowsmith CH, Poirier GG, Benchimol S. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J* 1997; 16: 6018–6033.
- 46) Von Zglinicki T, Pilger R, Sitté N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 64–74.
- 47) Horiuchi S. Interspecies differences in the life span distribution: Humans versus Invertebrates. *Popul & Develop Rev* 2003; 29: 15–45.
- 48) Vaupel JW, Carey JR, Christensen K, Johnson TE, Yashin AI, Holm NV, Iachine IA, Kannisto V, Khazaeli AA, Liedo P, Longo VD, Zeng Y, Manton KG, Curtsinger JW. Biodemographic trajectories of longevity. *Science* 1998; 280:855–860.
- 49) Fernandez-Ballesteros R, Diez-Nicholas J, Ruiz-Torres A. Aging in Europe. Editors Schroots J, Fernandez-Ballesteros R, Rudinger G., Amsterdam, IOS Pres, 1999, p:107-121.
- 50) Wilmoth, JR, Deegan LJ, Lundstrom H, Horiuchi S. Increase of maximum life span in Sweden, 1861–1999. *Science* 2000; 289: 2366–2368.
- 51) Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), 2009 Adrese Dayalı Nüfus Kayıt Sistemi Nüfus Sayımı Sonuçları (İnternette) 2009, Erişim 06.08.2010, <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=6178>

- 52) Balin AK, Goodman DB, Rasmussen H, Cristofalo VJ. The effect of oxygen and vitamin E on the life span of human and the dysregulation of Ras signaling in diploid cells in vitro. *J Cell Biol* 1977; 74: 58–67.
- 53) United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division, (İnternette) 2006, Erişim13.08.2010, www.UN.org/esa/population/publications/wpp.2006.
- 54) Gurwitz JH. The age/gender interface in geriatric pharmacotherapy. *J Womens Health (Larchmt)* 2005; 14: 68–72.
- 55) Carranza J, Alarcos S, Sanchez-Prieto CB, Valencia J, Mateos C. Disposable-soma senescence mediated by sexual selection in an ungulate. *Nature* 2004; 432: 215–218.
- 56) Özcan K. Yaşlanmanın Dişi Ve Erkek Sıçanların Mitokondriya Superoksit Dismutaz Ekspresyonuna Etkilerinin İncelenmesi. Evin Ademoğlu (Danışman). *Biyokimya Uzmanlık Tezi; İstanbul; 2007*.
- 57) Medvedev Z. An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1990; 65: 375–398.
- 58) Cankurtaran M. Geriatriye Karşı AntiAging. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2008; 28: 110–114.
- 59) Evans DA, Burbach JP, Van Leeuwen FW. Somatic mutations in the brain: relationship to aging? *Mutat Res* 1995; 338: 173–182.
- 60) Morley AA. The somatic mutation theory of ageing. *Mutat Res* 1995; 338: 19–23.
- 61) Vijg J, Gossen JA. Somatic mutations and cellular aging. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Physiol* 1993; 104: 429–437.
- 62) Fabris N. Biomarkers of aging in the neuroendocrine-immune domain. Time for a new theory of aging? *Ann N Y Acad Sci* 1992; 663: 335–348.
- 63) Khavinson VKH. Peptides and Ageing. *Neuro Endoc Lett* 2002; 23 Suppl 3: 111–144.

- 64) McClearn GE. Biogerontologic theories. *Exp Gerontol* 1997; 32: 3–11.
- 65) Barja G. Free radicals and aging, trends. *Neuroscience* 2004; 27: 595–600.
- 66) Yu BP, Chen JJ, Kang CM, Choe M, Maeng YS, Kristal BJ. Mitochondrial aging and lipoperoxidative products. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 786: 44–56.
- 67) Miquel J. An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutat Res* 1992; 275: 209–216.
- 68) Bryan TM, Reddel RR. Telomere Dynamics and Telomerase Activity in In vivo Immortalised Human Cells. *Europ J Canc* 1997; 33: 767–773.
- 69) Hayflick L. Aging under glass. *Mutat Res* 1991; 256: 69–80.
- 70) Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oksidative stres and free radical damage. *Alcohol Research & Health* 2003; 27: 277–284.
- 71) Aruoma O, Kaur H, Halliwell B. Oxygen free radicals and human diseases. *J R Soc Health*. 1991; 11: 172–177.
- 72) Kehrer JP, Smith CV. Free radicals in biology: Sources, reactivities, and roles in the etiology of human diseases. In: frei (ed). *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. Academic press, San Diego. 1994: 25–62.
- 73) Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology and medicine*. Oxford Sci Publ, Oxford. 1999.
- 74) Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol*. 1996; 46: 15–32.
- 75) Drode W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–95.
- 76) Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.
- 77) Asikainen TM, Raivio KO, Saksela M, Kinnula VL. Expression and developmental profile of antioxidant enzymes in human lung and liver. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 942–949.

- 78) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95, 351–358.
- 79) Marnett LJ. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mut Res Fund Mol Mech Mutagen* 1999; 424: 83–95.
- 80) Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 1991; 266: 2005–2008.
- 81) Starke-Reed PE, Oliver CN. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 1989; 275: 559–567.
- 82) Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 2003; 329: 23–38.
- 83) Sancar A, Reardon JT. Nucleotide excision repair in *E. coli* and man. *Adv Protein Chem* 2004; 69: 43–71.
- 84) Lim KS, Jeyaseelan K, Whiteman M, Jenner A, Halliwell B. Oxidative damage in mitochondrial DNA is not extensive. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1042: 210–220.
- 85) Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays* 2004; 26: 533–542.
- 86) Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* 1991; 281: 9–19.
- 87) Zastawny TH, Altman SA, Randers-Eichhom L, Madurawe R, Lumpkin JA, Dizdaroglu M, Rao G. DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with iron ions. *Free Rad Biol Med* 1995; 18: 1013–1022.
- 88) Dizdaroglu M. Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Free Radic Res* 1998; 29: 551–563.

- 89) De Martinis BS, de Lourdes Pires Bianchi M. Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by HPLC with electrochemical detection. *Pharmacol Res* 2002; 46: 129–131.
- 90) Muller HJ. The remaking of chromosomes. *Collecting Net* 1938; 13: 182–198.
- 91) Dubrana K, Perrod S, Gasser SM. Turning telomeres off and on. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 281–289.
- 92) Henderson E, Larson D, Melton W. Structure, synthesis and regulation of telomeres. *Cancer Cells* 1988; 6: 453–461.
- 93) Riethman HC, Xiang Z, Paul S, Morse E, Hu XL, Flint J, Chi HC, Grady DL, Moyzis RK. Integration of telomere sequences with the draft human genome sequence. *Nature* 2001; 409: 948–951.
- 94) Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* 1998; 12: 1073–1085.
- 95) Meyerson M. Telomerase enzym activation and human cell immortalization. *Toxicology Letters* 1998; 102–103: 41–45.
- 96) Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 1985; 43: 405–413.
- 97) Gorham H, Yoshida K, Sugino T. Telomerase activity in human gynaecological malignancies. *J Clin Pathol* 1997; 50: 501–504.
- 98) Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269: 1236–1241.
- 99) Nakayama T, Kyo S, Takakura M. hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998; 78: 539–543.
- 100) Horikawa I, Oshimura M, Barrett JC. Repression of the telomerase catalytic subunit by a gene on human chromosome 3 that induces cellular senescence. *Molecular Carcinogenesis* 1998; 22: 65–72.

- 101) Sun D, Lopez-Guajardo CC, Quada J. Regulation of catalytic activity and processivity of human telomerase. *Biochemistry* 1999; 38: 4037–4044.
- 102) Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulić V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2109–2117.
- 103) Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458–460.
- 104) Olovnikov A. Theory of Marginalotomy. *J. Theor Biol* 1973; 41: 181–190.
- 105) Chen Q, Ames BN. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 4130–4134.
- 106) Toussaint O, Fuchs SY, Ronai ZA, Isoyama S, Yuko N, Petronilli V, Bernardi P, Gonos ES, Dumont P, Remacle J. Reciprocal relationships between the resistance to stresses and cellular aging. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 851: 450–465.
- 107) Palmero I, Pantoja C, Serrano M. p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* 1998; 395: 125–126.
- 108) Kawanishi S, Oikawa S, Murata M, Tsukitome H, Saito I. Site-specific oxidation at GG and GGG sequences in double-stranded DNA by benzoyl peroxide as a tumor promoter. *Biochemistry* 1999; 38: 16733–16739.
- 109) Hayflick L, Moorhead PS. The Serial Cultivation of Human Telomerase Activity Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585–621.
- 110) Morin GB. Telomere Control of Replicative Lifespan. *Exp Gerontol* 1997; 32: 375–382.
- 111) Dikmen G, Doğan P. Telomeraz ve Kanser. *T Klin Tıp Bilimleri* 2003; 23: 334–341.
- 112) Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, Weinberg RA. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic

- expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene* 1998; 16: 1217–1222.
- 113) Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension Of Life-Span By Introduction Of Telomerase Into Normal Human Cells. *Wescience* 1998; 279: 349–352.
- 114) Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998; 396: 84–88.
- 115) Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, Weinberg RA. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 1999; 5: 1164–1170.
- 116) Armstrong L, Saretzki G, Peters H, Wappler I, Evans J, Hole N, von Zglinicki T, Lako M. Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage. *Stem Cells* 2005; 23: 516–529.
- 117) Von Zglinicki T, Saretzki G. Replicative Aging, Telomeres, and Oxidative Stres. *Ann NY Acad Sci* 2002; 959: 24–29.
- 118) Makpol S, Abidin AZ, Sairin K, Mazlan M, Top GM. gamma-Tocotrienol prevents oxidative stress-induced telomere shortening in human fibroblasts derived from different aged individuals. *Oxid Med Cell Longev* 2010; 3: 35–43.
- 119) Chen J, Patschan S, Goligorsky MS. Stres induced premature senescence of endothelial cells. *J Nephrol* 2008; 21: 337–344.
- 120) Massard C, Zermati Y, Pauleau AL, Larochette N, Métivier D, Sabatier L. hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2006; 25: 4505–4514.
- 121) Büchner N, Zschauer TC, Lukosz M, Altschmied J, Haendeler J. Downregulation of mitochondrial telomerase reverse transcriptase induced by H2O2 is Src kinase dependent. *Experimental Gerontology* 2010; 45: 558–562.

- 122) Haendeler J, Hoffmann J, Brandes RP, Zeiher AM, Dimmeler S. Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 4598–4610.
- 123) The Nobel Prize in Physiology or Medicine (İnternette) 2009. Erişim 09.08.2010, http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2009/press.html.
- 124) Mc Cay C, Crowell M, Maynard L. The effect of retarded growth upon the length of life and upon ultimate size. *Journal Nutrition* 1935; 10: 63–79.
- 125) Weindruch R, Walford R. The reduction of aging and disease by dietary restriction. Ed. Charles C. Thomas, St Louis, 1988.
- 126) Gredilla R, Sanz A, López-Torres M, Barja G. Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J* 2001; 22: 1589–1591.
- 127) López-Torres M, Gredilla R, Sanz A, Barja G. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 882–889.
- 128) Sanz A, Caro P, Ibáñez J, Gomez J, Gredilla R, Barja G. Dietary restriction at old age lowers mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I and oxidative DNA damage in rat brain. *J Bioenerg Biomembranes* 2005; 37: 83–90.
- 129) Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A., Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of Enos. *Science* 2005; 310: 314–317.
- 130) López-Lluch G, Hunt N, Jones B, Zhu M, Jamieson H, Hilmer S, Cascajo MV, Allard J, Ingram DK, Navas P, De Cabo R. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *PNAS* 2006; 103: 1768–1773.

- 131) Youngman LD, Park JYK, Ames BN. Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 9112–9116.
- 132) Yunbo Li, Zhu H, Trush MA. Detection of mitochondria-derived reactive oxygen species production by the chemilumigenic probes lucigenin and luminol. *Biochimic Biophysic Acta* 1999; 1428: 1–12.
- 133) Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233: 357–363.
- 134) Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16: 12-15.
- 135) Tuo J, Jaruga P, Rodriguez H, Bohr VA, Dizdaroglu M. Primary fibroblasts of Cockayne syndrome patients are defective in cellular repair of 8-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine resulting from oxidative stres. *FASEB J* 2003; 17: 668–674.
- 136) Tuo J, Müftüoglu M, Chen C, Jaruga P, Selzer RR, Brosh RM, Rodriguez H, Dizdaroglu M, Bohr VA. The Cockayne syndrome group B gene product is involved in general genome base excision repair of 8-hydroxyguanine in DNA. *J Biol Chem* 2001; 276: 45772–45779.
- 137) Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1995; 195: 80–83.
- 138) Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987; 8: 93–99.
- 139) Merrill CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 1981; 211: 1437–1438.
- 140) Stoscheck CM. Quantitation of protein. *Meth Enzym* 1990; 182: 50–59.

- 141) Pamplona R, Barja G. Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Res* 2007; 6: 189–210.
- 142) Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, Forster MJ, Lal H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the Mouse. *Mech Ageing Dev* 1994; 74: 121–133.
- 143) Leto S, Kokkonen GC, Barrows CH. Dietary protein, life-span, and biochemical variables in female mice. *J Gerontol* 1976; 31: 144–148.
- 144) Stoltzner G. Effects of life-long dietary protein restriction on mortality, growth, organ weights, blood counts, liver aldolase and kidney catalase in Balb/C mice. *Growth* 1977; 41: 337–348.
- 145) Fernandes G, Yunis EJ, Good RA. Influence of diet on survival of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 1279–1283.
- 146) Barrows CH, Kokkonen G. Protein synthesis, development, growth and life span. *Growth* 1975; 39: 525–533.
- 147) Horakova M, Deyl Z, Hausmann J, Macek K. The effect of low protein-high dextrin diet and subsequent food restriction upon life prolongation in Fischer 244 male rats. *Mech Ageing Dev* 1988; 45: 1–7.
- 148) Davis TA, Bales CW, Beauchene RE. Differential effects of caloric and protein restriction in the aging rat. *Exp Gerontol* 1983; 18: 427–435.
- 149) Gredilla R, Barja G, López-Torres M. Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria, and location of the free radical source. *J Bioenerg Biomembranes* 2001; 33: 279–287.
- 150) Gredilla R, López-Torres M, Barja G. Effect of time of restriction on the decrease in mitochondrial H₂O₂ production and oxidative DNA damage in the heart of food-restricted rats. *Microsc Res Tech* 2002; 59: 273–237.

- 151) Drew B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, Barja G, Leeuwenburgh C. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: 474–480.
- 152) Ayala V, Naudí A, Sanz A, Caro P, Portero-Otin M, Barja G, Pamplona R. Dietary protein restriction decreases oxidative protein damage, peroxidizability index, and mitochondrial complex I content in rat liver. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; 62: 352–360.
- 153) López-Torres M, Barja G. Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction possible implications for humans. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780: 1337–1347.
- 154) Caro P, Gomez J, Sanchez I, Garcia R, López-Torres M, Naudí A, Portero-Otin M, Pamplona R, Barja G. Effect of 40% restriction of dietary amino acids (except methionine) on mitochondrial oxidative stress and biogenesis, AIF and SIRT1 in rat liver. *Biogerontology* 2009; 10: 579–592.
- 155) Caro P, Gómez J, Sánchez I, López-Torres M, Barja G. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. Effect of restricting amino acids except methionine on mitochondrial oxidative stress. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2009; 44: 194–199.
- 156) Kiefer A, Lin J, Blackburn E, Epel E. Dietary restraint and telomere length in pre- and postmenopausal women. *Psychosom Med* 2008; 70: 845–849.
- 157) O'Callaghan NJ, Clifton PM, Noakes M, Fenech M. Weight loss in obese men is associated with increased telomere length and decreased abasic sites in rectal mucosa. *Rejuvenation Res* 2009; 12: 169–176.

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

TELİF HAKKI İZİNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Sevda	Soyadı	Tanrıkulu Küçük
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	06.01.1980
Uyruğu	TC	TC Kim No	25438086792
Email	sevdat@istanbul.edu.tr	Tel	535 8168732

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü. İst Tıp Fak. Biyokimya ABD	2010
Yük.Lis.	İ.Ü. İst Tıp Fak. Biyokimya ABD	2004
Lisans	İ.Ü. Fen Fak. Biyoloji Bölümü	2001
Lise	Çemberlitaş Kız Lisesi	1997

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma görevlisi	İ.Ü. İst Tıp Fak. Biyokimya ABD	2001'den beri

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi	60	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	54.8	57.8	60.8

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	İyi

ULUSLARARASI YAYINLAR

- Hepgül G, **Tanrıkulu S**, Unalp HR, Akguner T, Erbil Y, Olgaç V, Ademoğlu E. Preventive Effect of Pentoxifylline on Acute Radiation Damage via Antioxidant and Anti-inflammatory Pathways. Dig Dis Sci 2010; 55: 617-625
- Tanrıkulu S**, Ademoğlu E, Gurdol F, Mutlu-Turkoglu U, Bilge AK, Nisanci Y. Association of cholesteryl ester transfer protein -629C > A polymorphism with high-density lipoprotein cholesterol levels in coronary artery disease patients. Cell Biochem Funct. 2009; 27(7): 452-457.

3. Baser U, Cekici A, **Tanrikulu-Kucuk S**, Kantarci A, Ademoglu E, Yalcin F. Gingival inflammation and interleukin-1 Beta and tumor necrosis factor-alpha levels in gingival crevicular fluid during the menstrual cycle. *J Periodontol* 2009; 80(12): 1983-1990.
4. Doğru-Abbasoğlu S, **Tanrikulu S**, Ademoğlu E, Erbil Y, Ozderya A, Karadađ B, Uysal M. Polymorphisms of DNA base-excision repair genes APE/Ref-1 and XRCC1 are not associated with the risk for Graves' disease. *Cell Biochem Func.* 2009; 27(7): 462-467.
5. Tutar E, Ertem D, Unluguzel G, **Tanrikulu S**, Haklar G, Celikel C, Ademoglu E, Pehlivanoglu E. Reactive oxygen species and chemokines: are they elevated in the esophageal mucosa of children with gastroesophageal reflux disease? *World J Gastroenterol* 2008; 14(20): 3218-3223.
6. **Tanrikulu S**, Erbil Y, Ademoglu E, Işsever H, Barbaros U, Kutlutürk F, Ozarmagan S, Tezelman S. The predictive value of CTLA-4 and Tg polymorphisms in the recurrence of Graves' disease after antithyroid withdrawal. *Endocrine* 2006 ; 30(3): 377-381
7. Ademoğlu E, Ozbey N, Erbil Y, **Tanrikulu S**, Barbaros U, Yanik BT, Bozboru A, Ozarmađan S. Determination of oxidative stress in thyroid tissue and plasma of patients with Graves' disease. *Eur J Intern Med* 2006 ; 17(8): 545-550.
8. Ademoglu E, Tamer S, Albeniz I, Gokkusu C, **Tanrikulu S**. Cyclosporin A-associated changes in red blood cell membrane composition, deformability, blood and plasma viscosity in rats. *Acta Haematol* 2004; 112(4): 184-188

KATILDIđI MESLEKİ EğİTİMLER ve KURSLAR

1. Tibbi Laboratuarlarda Standardizasyon ve Kalite Guvencesi (2002)
2. Kık Hücru Kursu (2005)
3. Proteomik Kursu (2005)
4. Uygulamalı Deney Hayvanları Kursu (2006)
5. Klinik Biyokimya İleri Teknolojiler Kursu (2008)
6. Elektroforez Kursu (2008)
7. Genetics And Statistics, Quality Control (2009)
8. Stem Cells: From Analysis To Clinical Applications (2009)

ULUSLARARASI BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN BİLDİRİLER

- 1) **III. International Congress Of Molecular Medicine From Cell To Bedside, Harbiye Military Museum, İstanbul, Turkey may 5-8 2009** Semra Doğru-Abbasoğlu, **Sevda Tanrıkulu**, Evin Ademoğlu, Yeşim Erbil, Müjdat Uysal Single Nucleotide Polymorphisms Of DNA Base-Excision Repair Genes APE/REF-1 And XRCC1 Are Not Associated With The Risk For Grave's Disease Abstract Book p. 377.
- 2) **31th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS), Istanbul, Turkey June 24-29 2006** **Sevda Tanrıkulu**, Ümit Mutlu-Türkoğlu, Koray Özcan, Evin Ademoğlu The association of paraoxonase polymorphisms PON1-L55M and PON1-R192Q with coronary artery disease in Turkish population Abstract Book .
- 3) **XXIII. World Congress Of Pathology And Laboratory Medicine, İstanbul, Turkey May 26-30 2005** Evin Ademoğlu, **Sevda Tanrıkulu** Common polymorphisms in the CETP gene and their relation to plasma lipids in Turkish patients with coronary artery disease Abstract Book p.179.
- 4) **28th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS), Istanbul, Turkey Oct 20-25 2002**, Ademoğlu E, Ertem D., Baysoy G., **Tanrıkulu S.**, Pehlivanoğlu E.. The Role of Ascorbic Acid and Virulance in Iron Deficiency Anemia Associated With Helicobacter Pylori Infection. Abstract Book p. 90.

ULUSAL BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN BİLDİRİLER

- 1) **VI. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Porto Bello Otel, Antalya, 27-30 Nisan 2006** **Sevda Tanrıkulu**, Koray Özcan, Evin Ademoğlu, Yeşim Erbil, Burcu Tulumoğlu Yanık, Neşe Özbey Grave's hastalığında plazma/doku oksidatif stres parametrelerinin değerlendirilmesi Özet Kitabı p.89.
- 2) **Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği IV.Ulusal Kongresi, Larespark Hotel/Lara Antalya, 9-12 Mayıs 2005** E. Ademoğlu, **S. Tanrıkulu**, Erbil Y, Barbaros U. Basedow-Graves hastalarının plazma ve tiroid dokularında oksidan-antioksidan sistemin incelenmesi. Özet kitabı s.
- 3) **IV. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Mares Otel, Marmaris, 5-9 Eylül 2004** **Sevda Tanrıkulu**., Evin Ademoğlu, Ümit Mutlu-Türkoğlu, Ahmet Bilge,

Ercüment Yılmaz, Yılmaz Nişancı Koroner arter hastalarında kolesterol ester transfer proteini Taq1B polimorfizmi Özet Kitabı s.94.

- 4) **IV. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Mares Otel, Marmaris, 5-9 Eylül 2004** Ümit Mutlu-Türkoğlu, **Sevda Tanrıkulu**, Evin Ademoğlu, Ahmet Bilge, Işıl Albeniz, Ercüment Yılmaz, Yılmaz Nişancı Kolesterol ester transfer proteini 629C/A polimorfizmi ile koroner kalp hastalığı arasındaki ilişki Özet Kitabı s. 95.
- 5) **IV. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Mares Otel, Marmaris, 5-9 Eylül 2004** Evin Ademoğlu, **Sevda Tanrıkulu**, Ümit Mutlu-Türkoğlu, Türk toplumunda kolesterol ester transfer proteini Taq1B polimorfizmi ve lipoprotein düzeyleri ile ilişkisi Özet Kitabı s. 95.
- 6) **Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği III.Ulusal Kongresi, Oruçoğlu Thermal Resort, Afyon. 27-30 Mart 2003** E. İlhan, **S. Tanrıkulu**, Ü. Mutlu-Türkoğlu, E. Ademoğlu, Yılmaz E, Bilge A, Nişancı Y, Aykaç Toker G, Uysal M. Koroner Arter Hastalarında Ldl'nin Lipit Peroksidasyonuna Duyarliliği Ve Paraoksonaz Aktivitesi. Özet Kitabı s. 25
- 7) **Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği III.Ulusal Kongresi, Oruçoğlu Thermal Resort, Afyon. 27-30 Mart 2003** E. Ademoğlu, **S. Tanrıkulu**, Ü. Mutlu-Türkoğlu, A. Aslan, A. Bilgin-Karabulut, A.Arıncı Temporamandibuler eklem disfonksiyonu ve ağrı sendromlu hastaların eklem sıvısında prostaglandin E₂, Lökotrien B₄, myeloperoksidaz, nitrik oksit ve malondaldehit düzeyleri ve Wilkes sınıflamasıyla korelasyonu. Özet Kitabı s. 41
- 8) **3.Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjioloji Kongresi, The Marmara Hotel, İstanbul, 30 Eylül-3 Ekim 2002** Evin Ademoğlu, Şule Tamer, Işıl Albeniz, Sibel Bıkmaz, Sevda Akgül, **Sevda Tanrıkulu**, Cahide Gökkuşu. Siklosporin A'nın hemoreolojik parametreler üzerine etkileri Özet Kitabı s.286.