

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**“STOBADİN VE RESVERATROLÜN YAŞLI TAVŞAN BEYİN  
HASARINA ETKİSİ”**

**Aslı YÜRÜKOĞLU**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2011**



**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

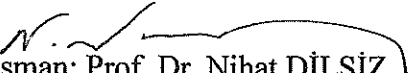
**“STOBADİN VE RESVERATROLÜN YAŞLI TAVŞAN BEYİN  
HASARINA ETKİSİ”**


**Aslı YÜRÜKOĞLU**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2011**

Prof. Dr. Nihat DİLSİZ'in danışmanlığında, Aslı YÜRÜKOĞLU'nun hazırladığı 'Stobadin ve Resveratrolün Yaşlı Tavşan Beyin Doku Hasarına Etkisi' başlıklı tezi 31.01.2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

  
Danışman: Prof. Dr. Nihat DİLSİZ

  
Üye : Doç. Dr. Davut Hamit MUSA

  
Üye : Yrd. Doç. Dr. Yeşim SOYER

**Bu tezin Biyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldığını ve enstitümüz kurallarına göre düzenlendiğini onaylarım.**

  
Prof. Dr. Mehmet CİCİ  
Enstitü Müdürü

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün veya başka kaynaktan yapılan bildirimlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

ÖZ.....	I.
ABSTRACT.....	II.
TEŞEKKÜR.....	III.
ÖNSÖZ.....	IV.
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V.
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI.
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	VII.
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Yaşlanma.....	4
2.1.1. Yaşlanma Nedir..?.....	4
2.1.2. Yaşlanma İle İlgili Teoriler.....	5
2.1.2.1. Dış Etkenler (Stochastic).....	5
2.1.2.1.1. Somatik Mutasyon Teorisi.....	5
2.1.2.1.2. Ölümcül Hata (Error-Katastrofe) Teorisi.....	6
2.1.2.1.3. Proteinlerin Değişikliğe Uğraması.....	6
2.1.2.1.4. Oksidatif Stres.....	7
2.1.2.2. İç Etkenler (Gelişimsel-Kalıtıl).....	8
2.1.2.2.1. Uzun Yaşama (Longevity) genleri.....	8
2.1.2.3.2. Artan Yaşlılık Sendromları.....	9
2.1.2.3.3. Nöroendokrin Teori.....	9
2.1.2.3.4. İmmünolojik teori.....	9
2.1.2.3.5. Hüresel Yaşlanma (Senescence) Teorisi.....	9
2.1.2.2.6. Hücre Ölümü.....	10
2.2. Oksidatif Denge ve Oksidatif Stres.....	11
2.2.1. Serbest Radikal Nedir?.....	12
2.2.2. Serbest Radikaller Nasıl Oluşur?.....	12
2.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri.....	16
2.2.3.1. Serbest Radikallerin Yağlara Etkileri (Lipit Peroksidasyonu).....	17
2.2.3.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	18
2.2.3.2.1. Protein Oksidasyonu Türleri.....	19
2.2.3.2.2. Protein Oksidasyonu Mekanizmaları.....	20
2.2.3.2.3. Protein Oksidasyonu İle İlişkili Hastalıklar.....	24
2.2.3.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri.....	27
2.2.3.4. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri.....	27
2.3. Antioksidanlar.....	28
2.3.1. Antioksidan Nedir?.....	28
2.3.3. Antioksidanlar Nasıl Etki Ederler?.....	28
2.3.4. Antioksidan eşitleri.....	29
2.4. Apoptozis.....	31
2.5. Beyin, Apoptozis ve Yaşlanma.....	32
2.6. Resveratrol.....	33

2.6.1. Resveratrolün Kimyasal Yapısı.....	33
2.6.2. Resveratrolün Sentezi.....	34
2.6.3. Ekstraksiyon ve Analizi.....	34
2.6.4. Resveratrolün Ticari Üretimi.....	35
2.6.5. Resveratrolün Biyolojik Etkileri.....	35
2.7. Stobadin.....	36
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	38
3.1. Deney Hayvanlarının .....	38
3.1.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Gruplandırılması.....	38
3.2. Deneysel Uygulamalar.....	38
3.3. DNA Fragmentasyonu (Apoptozis) Analizi.....	39
3.4. Nitrik Oksit Analizi.....	41
3.5. GSH Analizi.....	43
3.5.1. Okside Glutasyon.....	43
3.5.2. Toplam Glutasyon.....	44
3.6. Protein Miktar Tayini.....	45
3.7. Protein Karbonil Analizi.....	46
3.8. Proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel (SDS-PAGE) Elektroforezi İle İncelenmesi.....	47
3.9. Proteinlerin İmmüno Blot Analizi (Western Blot).....	47
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	49
4.1 Araştırma Bulguları.....	49
4.1.1. Klinik Sonuçlar.....	49
4.1.2. GSH Analizi Sonuçları.....	49
4.1.3. Protein Karbonil (PCO) Analizi Sonuçları.....	52
4.1.4. Nitrik Oksit Analizi Sonuçları.....	52
4.1.5. DNA Fragmentasyonu (Apoptozis) Analizi Sonuçları.....	53
4.1.6. Proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel (SDS-PAGE) Elektroforezi ve İmmüno Blot Analiz (Western Blot) Sonuçları.....	54
4.2. Tartışma.....	55
4.2.1. Beyin GSH.....	55
4.2.2. Nitrik Oksit.....	56
4.2.3. Protein Karbonil (PCO).....	57
4.2.4. Beyin Apoptozis.....	58
4.2.5. İmmüno Blot (Western Blot).....	58
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	59
5.1. Sonuçlar.....	59
5.2. Öneriler.....	61
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	70
ÖZET.....	71
SUMMARY.....	74

## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### STOBADİN VE RESVERATROLÜN YAŞLI TAVŞAN BEYİN HASARINA ETKİSİ

Aslı YÜRÜKOĞLU

Harran Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nihat DİLSİZ  
Yıl: 2011, Sayfa: 74

Bu çalışmada yaşlı tavşanlara 90 gün boyunca 48 saatte bir verilen resveratrol ve stobadin maddelerinin beyin dokusunda oluşmuş hasara karşı etkisi incelendi. Tavşanlar genç kontrol, yaşlı kontrol, yaşlı + resveratrol, ve yaşlı + stobadin olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Yaşlı + resveratrol grubuna DMSO'da çözülmüş resveratrol, yaşlı + stobadin grubuna ise zeytinyağında çözülmüş stobadin 25 mg/ml/kg olmak üzere verildi. Uygulama bitiminde tavşanların beyin dokusu alındı ve redükte glutatyon (GSH), protein karbonil, nitrik oksit (NO<sup>-</sup>), protein miktarı ve protein karbonil (PCO) düzeyleri tespit edildi. Ayrıca yine beyin dokusunda apoptozis ve immüno blot analizleri yapıldı. Çalışma sonunda deney gruplarında GSH seviyelerinin daha yüksek olması istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. NO<sup>-</sup> seviyesinin deney gruplarında kontrol grubuna göre daha düşük olması istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. PCO düzeylerinin deney gruplarında kontrol grubuna göre daha düşük olması istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

**ANAHTAR KELİMELER:** Resveratrol, Stobadin, Yaşlanma.

## **ABSTRACT**

**Master Thesis**

### **THE EFFECT OF RESVERATROL AND STOBADINE IN OLD RABBIT BRAIN DAMAGE**

**Ash YÜRÜKOĞLU**

**Harran University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Nihat DİLSİZ**

**Year: 2011, Page 74**

In this study, the effect of resveratrol and stobadine was investigated in old female rabbits brain damage. Rabbits split into four groups. Groups which include young control, old control, old control + resveratrol and old control + stobadine. Young control, old control and old control + stobadine groups which include 3 rabbits; old control + resveratrol group which include 5 rabbits. In this study on old rabbit brain tissues, it has been measured that levels of reduced glutathione (GSH), nitric oxide (NO), protein carbonyl (PCO) and amount of protein. Moreover apoptosis was examined in brain tissue. According to the results, it has been determined that amount of increase in GSH on young control, old kontrol+resveratrol and old kontrol+stobadine were statistically significant as compared to the old control group. It has also been determined that amount of decrease in NO on young control, old kontrol+resveratrol and old kontrol+stobadine were statistically significant as compared to the old control group. It has also been determined that amount of decrease in PCO on young control, old kontrol+resveratrol and old kontrol+stobadine were statistically significant as compared to the old control group.

**KEY WORDS:** Resveratrol, Stobadine and Aging



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca değerli bilgi ve deneyimini aktararak her zaman yanımda olan ve bu sürede sabır ve anlayışını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nihat DİLSİZ'e ve değerli zamanlarını ayırarak yardımını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Davut Hamit Musa'ya emek ve katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında destek ve yardımlarını gördüğüm sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Semih SAYIN'a ve yüksek lisans öğrencisi Çiğdem GÖVER'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yaşantımın her döneminde hep yanımda hissettiğim ve her konuda destek olan sevgili anneciğim Zeliha YÜRÜKOĞLU'na, sevgili babacığım Kerim YÜRÜKOĞLU'na sevgili ablam Zeynep YÜRÜKOĞLU'na ve sevgili kardeşim S. Elif YÜRÜKOĞLU'na sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

*Annem ve Babama...*

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa  
No

Çizelge 2.1.	Protein oksidasyonu ile ilişkin hastalıklar ve oksidatif modifikasyon.....	25
Çizelge 3.1.	NO standartlarının hazırlanması.....	41
Çizelge 3.2.	NO örneklerinin hazırlanması.....	42
Çizelge 3.3.	GSH standartlarının hazırlanması.....	43
Çizelge 3.4.	Total glutatyon standartlarının hazırlanması.....	44
Çizelge 3.5.	Protein miktar tayini standartlarının hazırlanması.....	45
Çizelge 3.6.	Protein miktar tayini örneklerinin hazırlanması.....	45
Çizelge 3.7.	Protein karbonil standartlarının hazırlanması.....	46
Çizelge 4.1:	Beyin dokusu toplam glutatyon, GSSGve GSH düzeyleri.....	50

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa  
No

Şekil 2.1.	Antioksidan-serbest radikal dengesi.....	12
Şekil 2.2.	Serbest radikallerin etkileri.....	16
Şekil 2.3.	Protein karbonil oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları.....	20
Şekil 2.4.	NT reaksiyonları.....	23
Şekil 2.5.	Glutasyon'un Molekül Yapısı.....	31
Şekil 2.6.	Resveratrolün yapısı.....	34
Şekil 4.1.	Deney gruplarından elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	50
Şekil 4.2.	Deney gruplarının toplam glutasyon, GSSG ve GSH düzeyleri.....	51
Şekil 4.3.	Deney gruplarının toplam glutasyon, GSSG ve GSH düzeyleri.....	51
Şekil 4.4.	Deney gruplarının protein karbonil (PCO) düzeyleri.....	52
Şekil 4.5.	Deney gruplarının nitrik oksit düzeyleri.....	53
Şekil 4.6.	Beyin dokusu apoptozis görüntüsü.....	54
Şekil 4.7.	Beyin dokusu SDS-PAGE görüntüsü.....	54
Şekil 4.8.	Beyin dokusu PVDF membran görüntüsü.....	55

## SİMGELER DİZİNİ

nm	: Nanometre
GSH	: Glutasyon
LOO	: Lipitperoksil radikali
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat redükte formu
LPO	: Lipid peroksidasyonu
UV	: Ultraviyole
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
OH•	: Hidroksil radikali
NO•	: Nitrik oksit radikali
H <sup>+</sup>	: Hidrojen iyonu
-SH	: Tiyol grubu
PCO	: Protein karbonil
NT	: Nitrotirozin
ONOO-	: Peroksinitrit
AOPP	: İleri oksidasyon ürünleri
RNA	: Ribonükleik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
LPO	: Lipit peroksidasyonu
DMSO	: Di metil sülfoksit
pmol	: Piko mol

## 1. GİRİŞ

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler (Akkuş, 1996). Oksidanlar aerobik organizma tarafından sürekli ve yüksek oranda üretilirler (Gülbahar, 2006). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Vücutta serbest radikaller meydana geldiğinde organizmayı oksidatif strese korumak için antioksidan sistem devreye girer. Birinci defans hattını, peroksidaz ve metal bağlayan proteinlerin süpresyonu ile serbest radikallerin meydana gelmesini önleyen antioksidanlar oluşturur. İkinci defans hattını, vitamin C ve vitamin E gibi radikal temizleyici antioksidanların zincir oksidasyonunun başlamasını inhibe etmesi ve zincirleme reaksiyonların yayılımını önlemesi oluşturmaktadır. Üçüncü olarak da hasarı onarma ve eski haline getirmeye çalışan onarıcı ve yeniden yapılandırıcı enzimler (lipazlar, proteazlar, DNA onarıcı enzimler ve transferazlar gibi) defansta rol alırlar (Willcox ve ark., 2004).

Organizmada serbest radikallerin oluşma hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı arasında bir denge söz konusudur. Bu durum 'oksidatif denge' olarak adlandırılır. Oksidatif dengenin serbest radikaller lehine bozulması ile hücrelerdeki protein, yağ, karbonhidrat, nükleik asit gibi makromoleküllerin kompozisyonunda değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler sonucunda da hastalıklar oluşur. Kansere, diyabete, ateroskleroz, Parkinson hastalığı, kistik fibrozis bu hastalıklardan bazılarıdır (Gülbahar, 2006).

Oksidanlar DNA, lipit ve protein makromoleküllerinde oluşturdukları hasarların artması sonucunda yaşlanmaya ve yaşa bağlı dejeneratif hastalıkların oluşmasına da katkıda bulunabilirler (Gülbahar, 2006).

Kaçınılmaz bir süreç olan yaşlanma, fizyolojik fonksiyonlarda genel bir azalma ile karakterizedir (Shigenaga, 1994; Gülbahar, 2006). Yaşlanma, birçok enzimin

ısıya daha duyarlı formlarının oluşması, aktivitelerinde azalma veya tamamen inaktive olması gibi enzim fonksiyonlarında bozulmaların artışı ile ilişkilidir. Yaşlı hücrelerde bazı proteinlerin inaktif formlarının biriktiği de gösterilmiştir. Lipofuscin gibi protein içeren ‘yaş pigmentleri’ bazı dokularda birikir. Yaşlanma ile gerbil dokularında protein karbonil düzeylerinin arttığı da gösterilmiştir. Muhtemelen yaşa bağlı bu değişikliklerin çeşitli nedenlerle indüklenen oksidatif modifikasyonlar nedeniyle ortaya çıktığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır: Enzimlerin *in-vitro* olarak ROS’a maruz kalması, yaşlanmada görülen değişikliklere benzer şekilde, enzimlerin katalitik aktivitesinde, ısı stabilitesinde ve proteolitik duyarlılıklarında bozulmalara yol açmaktadır. Hayvanların oksidatif strese kısa süreli maruz kalmaları da, enzimlerde, yaşlanmada gözlenen değişikliklere benzer değişikliklere yol açmaktadır. Yaşlı hayvanlar oksidatif stresin neden olduğu protein hasarına genç hayvanlardan daha duyarlıdır (Berlett, 1997; Gülbahar, 2006).

Protein karbonil içeriğinde yaşa bağlı bir artış olduğu insan beyni, gerbil beyni, göz lensi, sıçan hepatositleri, sineklerin tüm vücut proteinleri ve insan eritrositlerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Protein karbonil içeriğinde artışa yol açan rejimlerle yaşam süresini arttıran rejimler arasında ters bir ilişki söz konusudur. Örneğin kalori kısıtlamasının protein karbonil düzeylerinde bir azalmaya ve yaşam sürelerinde bir artışa neden olduğu sıçan ve fareler üzerinde yapılan çalışmalar göstermiştir. Aynı kronolojik yaşta kıyaslama yapıldığı zaman kısa yaşam süresine sahip ev sineklerinin uzun yaşayanlardan daha yüksek düzeylerde okside proteinlere sahip olduğu gözlenmiştir (Berlett, 1997; Gülbahar, 2006).

Çalışmamızda tavşan beyin dokusunda yaşlılığa bağlı protein hasarı araştırılmış ve resveratrol ve stobadinin etkisi incelenmiştir.

Fitoaleksinler, bitkilerde mikrobiyal enfeksiyon, yaralanma ve ultraviyole ışıklara tepki olarak sentezlenen düşük molekül ağırlığındaki ikincil metabolik maddelerdir. Resveratrol de bir fitoaleksin olup üzüm ve üzüm ürünleri ile yer fıstığı, yer fıstığı yağı, şam fıstığı, siyah çikolata ve kakao likörü gibi diğer bitkisel ürünlerde doğal olarak bulunan bir antioksidandır. Resveratrolün pıhtı önleyici,

çeşitli fungus ile virüs gelişimini durdurucu ve kansere karşı engelleyici etkisi vardır (Gülbahar, 2006).

Stobadin ise heterosiklik indol türevlerinden bir pridoinoldür (Steenka, 1992). Elektron redoks potansiyeli olması sebebiyle biyolojik sistemlerde iyi bir antioksidandır (Stasko, 1990).

Çalışmada aşağıdaki sonuçlara ulaşılmaması amaçlanmıştır:

Yaşlı tavşan beyin dokusunda resveratrol ve stobadin maddelerinin verildiği deney gruplarıyla, genç kontrol ve yaşlı kontrol grupları arasındaki nitrik oksit, protein karbonil ve GSH düzeylerinin karşılaştırılarak incelenmesi ve yine beyin dokusunda apoptozise bakılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, yaşlı tavşanlara 90 gün boyunca 48 saatte bir, DMSO'da çözülmüş resveratrol ve zeytinyağında çözülmüş stobadin oral yoldan verilmiştir. Deney sonucunda beyin dokusundaki nitrik oksit, protein karbonil ve GSH düzeyleri incelenmiştir. Ayrıca yine beyin dokusunda apoptozis analizi de yapılmıştır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Yaşlanma

#### 2.1.1. Yaşlanma nedir?

Yaşlanma insanlarda her şeye rağmen asla durmayan, devam eden biyolojik bir süreçtir. Fizyolojik kapasitede azalma ve çevresel stresler hastalıklara olan hassasiyeti de artırır. Sonuçta bütün bu etkenler yaşla birlikte ölüm riskinin de artmasına neden olur. Diğer taraftan, yaşlılığa ait değişiklikler moleküler seviyeden organizma seviyesine kadar her aşamada gerçekleşir. Bütün bu aşamalardaki çevresel, genetik ve benzeri etkenleri tespit etmemizin yanında yaşlanmayı objektif olarak gösterebilecek biyokimyasal belirteçlere de bu gün için sahip değiliz.

Buraya kadar bahsi geçen yaşlılık zaman ilişkili olarak kullanılan yaşlılıktır. Biyolojik olarak yaşlılığın tanımını yapmak ise oldukça zordur. Çünkü yaşlılık ve yaşlanma kelimeleri zaman içinde farklı anlamlar içerir. Ancak, genel olarak olgunluk sonrası anlaşılan ‘yaşlılık (aging)’ azalmış homeostazis ve artmış hassasiyet anlamına gelir. Gelişen bu süreçte bazı doğal değişiklikler gelişir ki bunlar çocukluk-puberte-geçer erişkin (matürasyon) ve orta-ileri yaşlar (geri dönüş) şeklindedir. Bunun dışında ‘normal yaşlanma’ sıradan, herkeste görülen fizyolojik azalmayı (menopoz, kreatin klirensinde azalma vs.) ve ‘alışılmış (usual aging)’ sıklıkla görülen patolojik olaylar bütünü (koroner damar hastalıkları) ifade eder (Armandola, 2005).

Biyolojik yaşlılığın tam karşılığını verebilecek kelime ise ‘senescence’ dir. Latince olan bu kelime olgunlaşmadan ölüme kadar geçen bütün süreyi ifade eder. ‘Yaşlılık bilimi’ açısından ise, sadece ölüme sona eren hücresel düzeydeki büyüme kapasitesinin ifadesidir. Dolayısıyla biyolojik yaşlanmanın genel özellikleri;

- Olgunluk döneminden sonra yaşlandıkça artmış mortalite,
- Yaşlı doku biyokimyasında meydana gelen değişiklikler,
- Yaşla azalmış fizyolojik değişiklikler,



- Hastalıklara artmış duyarlılık ve hassasiyettir (Nalbant, 2006).

### 2.1.2. Yaşlanma İle İlgili Teoriler

Yaşlanmanın temel prensip ve özelliklerini açıklamaya çalışan biyolojik mekanizmalar genellikle teori seviyesindedir ve hiç biri yaşlanmayı açıklamak için tek başına yeterli değildir. Bunlar:

#### Dış Etkenler (Stokastik):

- a. Somatik mutasyon ve DNA tamir teorileri,
- b. Ölümcül hata (Error-catastrophe) teorisi,
- c. Proteinlerin değişikliğe uğrama teorisi,
- d. Serbest radikal (oksidatif stres ) / mitokondriyal DNA,

#### İç Etkenler (Gelişimsel-Kalıtsal):

- a. Uzun yaşam (longevity) genleri,
- b. Artan yaşlılık sendromları,
- c. Nöroendokrin teori,
- d. İmmünolojik teori,
- e. Hücre yaşlılık (Senescence) teorisi,
- f. Hücre ölüm teorisi (Nalbant, 2006).

#### 2.1.2.1. Dış Etkenler (Stokastik):

Bu tip, rastlantısal olarak canlı moleküllerde oluşan hataların toplamının yaşlılığın gelişimine neden olduğunu savunur. Oluşan bu hataların yarattığı hasarlar sonucu birikim oluşur ve fizyolojik aktivite azalır. “Somatik mutasyon teorisi” bunun en bilinenidir.

#### 2.1.2.1.1. Somatik Mutasyon ve DNA Tamiri:

Bir rodent popülasyonuna iyonize radyasyon verildiğinde:

- İyonize radyasyon, popülasyonun ortalama yaşam süresini kısaltmıştır.

- Yaşam süresinde gelişen kısalma yaşlanma olmadan glomeruloskleroz ve artmış kanser gelişimine bağlı olarak gelişmiştir. Diğer bir deyişle bir dış etken organ seviyesinde farklılaşma yaratarak yaşam süresini etkilemiştir (Walburg, 1975).

DNA tamiri somatik mutasyon teorisinin daha özel bir şeklidir. Bu teoriye dayandırılan bir çalışmada, değişik türlerden elde edilen hücre kültürlerinde ultraviyole ile yaratılan DNA hasarının tamir edilebilirliği doğrudan ortalama yaşam süresi ile ilişkili bulunmuştur. Daha sonra bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda yeterli kanıt elde edilememiş olmasına rağmen yaşla DNA tamir yeteneğinin değişmediği sonucuna varılmıştır. Ancak, ortalama tamir yeteneği ve tamir hızından çok 'site-specific' tamir gibi DNA'nın özel bölgelerinin tamir yeteneğinde gelişen azalmanın daha önemli olduğu düşünülmektedir (Orgel, 1963).

#### **2.1.2.1.2. Ölümcül Hata (Error-Katastrophe) Teorisi:**

DNA veya diğer ara moleküllerin üretiminde yer alan protein sentezinde hata gelişimini esas alır. Hatalı molekül sentezi normal protein üretimi esnasında da olur ve temizlenir. İlginçtir ki, değişikliğe uğramış proteinler yaşlanan hücrelerde gelişmez. Hatalı ya da değişikliğe uğramış bu proteinler yaşlı hücrelerde azalmış klirens bağılı olarak birikir ve organizmanın ölümüne neden olur. Yaşlanma ile ilgili sayısız değişikliğe uğramış protein bildirilmesine rağmen yaşlılığa özgün bir protein bildirilmemiştir (Levine, 1966).

#### **2.1.2.1.3. Proteinlerin Değişikliğe Uğraması:**

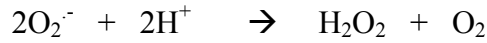
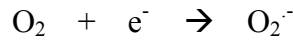
Proteinlerde meydana gelen değişiklikler yapısal değişikliklerin yanında fonksiyonel değişiklikler şeklinde de olabilir. Bu değişiklikler özellikle protein yapısındaki enzimlerde gerçekleşir. Bu enzimlerin spesifik fonksiyonları azalırken, ısıya cevapları da değişir (Gracy ve ark.1985). Diğer taraftan yapısal proteinlerde de bazı değişiklikler olur ve karbon içerikleri artar. Bu değişikliklerin mekanizmaları:

- Doğrudan oksidasyon,
- Metal-katalizörlü oksidasyon,
- Lipid oksidasyonu,
- Glikolizasyondur.

Bu mekanizmalarla ilgili bilgilerimizin son yıllarda artmasıyla birlikte bunlara karşı hem koruyucu hem de tedavi edici tıbbi yaklaşımlarda da önemli gelişmelerin gündeme gelmesi beklenmektedir. Özellikle enzimatik olmayan yoldan gelişen karbohidrat-proteinlerin amino grupları ile etkileşimi “İleri Glikozillenme Son Ürünleri” (Advanced Glycosylation end-products, AGE) ve amyloid birikimi bunlardan en iyi bilinenleridir.

#### 2.1.2.1.4. Oksidatif Stres:

İlk olarak “Harman” yaşlılığa bağlı değişikliklerin büyük çoğunluğunun elektron yükü bulunan molekül ve atomlardan kaynaklanan ve yüksek oranda reaktif olan serbest radikallere bağlı olduğu teorisini ortaya attı (Harman, 1956). Bu teoride aslında hem dış etkenler hem de gelişimsel ve kalıtsal özellikler geçerlidir. Aerobik metabolizma sonucunda superoksit radikaller ( $O_2^{\cdot-}$ ) gelişir. Bu radikaller superoksit dismutaz enzim tarafından hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve oksijene dönüştürülür.



İlk zamanlar hidrojen peroksit geliştikten sonra serbest oksijen radikallerinin doku hasarının son bulduğu sanılırdı. Ancak, bugün için bu moleküllerin daha reaktif olan hidroksil radikallere ( $OH\cdot$ ) dönüşebildiğini ve serbest radikallerin doku hasarı etkisinin daha da arttığını biliyoruz. Örneğin süperoksit dismutaz enziminin hayvanlarda aşırı üretimi onların yaşam sürelerini uzatmazken, süperoksit dismutaz enzimine ilave olarak ortamdan  $H_2O_2$  de uzaklaştırıldığında yaşam süresi uzamıştır. Buna karşın anti-oksidan uygulamalarına ait çalışmaların hiçbirinde yaşam sürelerinde anlamlı bir uzama saptanamamıştır. Reaktif oksijen radikalleri gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, hücre çoğalmasında ve apoptotik hücre ölümünde de rol alırlar (Linnane ve ark.1992; Wallace, 1992).

Serbest oksijen radikallerine ait metabolizma mitokondriyal olarak yürütülür. Yaşla birlikte çizgili kas, kalp kası, diyafram ve beyinde de mitokondriyal DNA'da progresif serbest oksijen radikali hasarı (mitokondriyal stres teorisi) gelişir. Meydana gelen bu hasarın kalp kasında 129 yaştan daha fazla yaşla bağdaşmayacağı hesaplanmıştır. Bu tip mitokondriyal

solunum hasarları sadece normal dokularda değil Parkinson, Alzheimer, Huntington Chorea ve diğer yaşla artan hareket bozukluklarında da artmaktadır. Ancak, kalori kısıtlamasıyla bu hasarın azaldığı gösterilmiştir. Serbest oksijen radikallerine bağlı yaşlanma ile ilgili teoriler bilimsel olarak kanıtlanamasa da ticari olarak çok ilgi görmüş, pek çok çalışma yapılmıştır. Yaşlanmayı yavaşlattığına dair en güçlü veriler aşağıdaki mekanizmalara aittir (Wallace,1992; Zaniel ve ark.2000):

- Ko-enzim Q10
- Tokoferol
- Nikotinamid
- Askorbik asid
- Kalori kısıtlaması
- Diyetset anti-oksidanlar

#### **2.1.2.2. İç Etkenler (Gelişimsel-Kalıtısal):**

Yaşlanmanın kalıtısal olarak programlanmış gelişimsel mekanizmalarla kontrol edilen bölümünü oluşturur. Tek ve çift yumurta ikizleri ile yapılan çalışmalarla önemli bilgilere ulaşılmış olmasına rağmen hala pek çok bilgiye ihtiyaç vardır.

##### **2.1.2.2.1. Uzun Yaşam (Longevity) Genleri:**

Uzun yaşam genleri ile ilgili çalışmalarda son 30 yılda çok uzun mesafeler alınmıştır. Özellikle “hasara karşı gelişen cevap” teorisinin geliştirilmesi ile bu çalışmalar farklı bir boyut kazanmıştır. Bu teoriye göre organizmada meydana gelen hasarlar birikime neden olmaktadır. Oluşan bu hasara karşı genetik kontrol mekanizmaları ile yanıt oluşturulmazsa yaşlılık gerçekleşmektedir. Bu mekanizmada genetik kontrolü oluşturan genlere “Longevity Genleri” ya da “Uzun Yaşam Genleri” denilmektedir. Bu teoride hasar yaratabilecek oluşumlardan en önemlisi metabolik olaylardır (Jazwinski, 1996; Murakami ve ark. 1996).

Yaşlılık ile ilgili gen çalışmaları daha çok nematodlarda çalışılmıştır (Nalbant, 2006).

##### **2.1.2.2.2. Artan Yaşlılık Sendromları:**

Bu tür hastalıklar yaşlılığın incelenmesi için uzun süredir model oluşturmuş ancak, bazı modeller hayal kırıklığı yaratmışlardır. Bu sendromların en çok incelenenleri Werner Sendromu, Down Sendromu ve Hutchinson-Gilford Sendromu'dur. Bu hastalıklar özellikle yaşlanmanın bütün fenotipik özelliklerini kısa sürede gösterdikleri için araştırmacılar için önemlidir (Mobbs, 1996).

#### **2.1.2.2.3. Nöroendokrin Teori:**

Bu teoride yaşlanmanın sadece nöronal ve nöronlarla ilgili hormonal mekanizmalarda fonksiyonel azalmaya bağlı olarak geliştiği savunulur. Bu teorinin en önemli dayanağı hipotaloma-hipofizer aksın büyümenin düzenlenmesinde ve yaşlanmanın temel mekanizmalarında yer alıyor olmasıdır. Özellikle kadınlarda üretkenlik sona erince bu aksın fonksiyonlarında da hızlı bir azalma olur. Bu teori hipofizektomi yapılmış farelerde de test edilmiş ve doğrulanmıştır. Diğer taraftan yaşam süreleri kısa olan farelerde beyin dopaminerjik iletinin azaldığı da gösterilmiştir. Bu konu ile yapılmış pek çok çalışma olmasına rağmen en önemli konu bulgulardan hangisinin patolojik, hangisinin yaşlılığa bağlı değişiklik olduğunun çözümlenememiş olmasıdır (Mobbs, 1996).

#### **2.1.2.2.4. İmmünolojik Teori:**

İmmünolojik teori iki temele dayanır:

**I.** Bağışıklık sisteminin fonksiyonel kapasitesi yaşla azalır. T hücrelerinde mitojenlere cevap ve enfeksiyöz hastalıklara direnç azalır.

**II.** Otoimmün hastalıklar ve otoimmün fenomen yaşla artar. Her iki teori de kuramsal olarak doğru olmasına rağmen bu teorilerin ispatlanamayan yönü ikincil mekanizmaların açıklanmamasıdır (Walford, 1975).

#### **2.1.2.2.5. Hücresel Yaşlanma (Senescence) Teorisi:**

Hücresel yaşlanmanın ve senescence'nin açıklanmasında hücre kültürleri en önemli araştırma materyalleridir. Ancak, olayın çok kompleks olması buna her zaman olanak tanımamaktadır. Hayfick ve Moorhead "replikatif senescence" olarak tanınan bir hücre

kültürü modeli geliştirdi. Bu modele göre yaşlanma sadece hücrel değil aynı zamanda organizmik bir mekanizmadır. Diğer bir deyişle olayı tek bir hücre bazında değil ama fonksiyonlarda ortalama bir azalma olarak değerlendirmek gerekir. Halen geçerli olan bu model sayesinde özellikle fibroblastların yaşlanması konusunda önemli gelişmeler sağlanmıştır (Hayflick ve ark. 1965).

Yaşla birlikte gelişen telomer kısalma fenomeni hücrelerin büyüme potansiyelleri (senescence) için kurulu bir saat gibidir. Telomerler kromozomların sonunda degradasyon ya da diğer kromozomlarla füzyonunu engelleyen yapılardır. Yaşla birlikte telomerlerin boyu özellikle lenfositlerde kısalırken, kök hücrelerde bir değişiklik olmamaktadır (Hemann ve ark. 2001).

p53 geni de hücre yaşam siklusunu, apoptozisi, DNA tamirini ve transkripsiyonunu kontrol ederek hücrel senescence devamında yer alır. Telomeraz aktivitesi olmayan farelerde p53 gen ekspresyonu aşırı şekilde artmaktadır. Aksine p53 delesyonunda ise, başlangıçta telomeraz aktivitesi azalmakta daha sonra büyük bir malign transformasyon oluşmaktadır (Ferbeyre, 2002).

Görüldüğü gibi hücrel senescence oldukça karışık ve tek bir mekanizmaya dayanmamaktadır. Bu nedenle başta moleküler biyoloji konusunda bazı teknik gelişmelere ihtiyaç bulunmaktadır. Bugün gelinen noktada esas ihtiyaç duyulan şey bazı yasal düzenlemelerdir (Nalbant, 2006).

#### **2.1.2.2.6. Hücre Ölümü:**

Hücre ölümü nekroz ve apoptozis olmak üzere iki şekilde görülebilir. Nekroz rastlantısal bir son olmasına karşın apoptozis genetik kontrol dahilinde (programlı olarak) ortaya çıkan hücre ölümüdür. Apoptozis, organ gelişimi, immün sistemin oluşumu, tümör ve normal doku oluşumu sırasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesidir (Dilsiz, 2009). Apoptozis homeostazın devamı açısından gereklidir. Engellendiğinde, malign transformasyon artarken kontrolsüz olarak arttığında total fonksiyon kaybı gelişmektedir. Programlanmış hücre ölümü ile apoptozis birbirinin yerine kullanılmasına rağmen aynı şeyi ifade etmemektedir. Programlanmış hücre ölümü gelişimsel bir olayken apoptozis hücre ölüm modellerinden

biridir. Apoptoziste inflamatuvar olay önemli bir yer tutarken programlanmış hücre ölümünde buna gerek yoktur (Ferbeyre ve ark. 2002; Grasl-Kraupp ve ark. 1994; Troen, 2003).

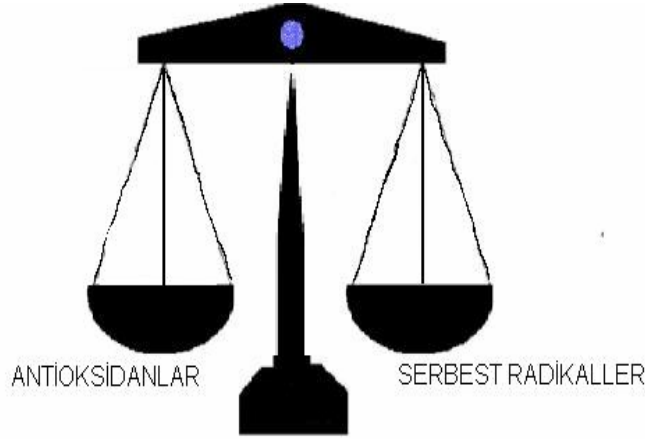
Mitokondriler serbest radikallerin ve apoptotik regülasyonda önem arzeden sinyal faktörlerinin kaynağını oluşturmaktadır (Dilsiz, 2009).

Birçok enzimatik reaksiyonda yan ürün olarak sürekli oluşan serbest radikaller (reaktif oksijen türleri (ROT), hidroksil radikali (HO $\cdot$ ), süperoksit anyonu (2O $_2$  $\cdot^-$ ), nitrik oksit (NO $\cdot$ ) gibi) hücre içerisinde DNA, protein ve lipit gibi makromoleküllerin yapısına bağlanarak onların oksidasyonuna ve sonuçta apoptozise neden olmaktadır. Antioksidan adı verilen moleküller ise kendi elektronlarını serbest radikallere vererek onları etkisiz hale getirir ve böylece apoptozis oluşumunu engellerler (Dilsiz, 2009).

Bu konuda yapılmış en önemli çalışmalardan biri olan kalori kısıtlaması ve apoptozisin ilişkisinin incelendiği Grasl ve James'in 1994'teki çalışmalarıdır. Her iki çalışmada da kalori kısıtlamasının T-lenfosit apoptozis hızını arttırdığı ve yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (Grasl-Kraupp ve ark. 1994).

## **2.2. Oksidatif Denge ve Oksidatif Stres:**

Organizmada serbest radikallerin oluşum miktarı ile bunların etkisizleşmesini sağlayan antioksidan miktarları arasında genelde bir denge söz konusudur ve bu durum 'oksidatif denge' olarak adlandırılır (Dilsiz, 2009). Serbest radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. 'Oksidatif stres' olarak adlandırılan bu durum özetle serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemi arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup sonuçta bir dizi metabolik bozukluk ve hastalığa yol açmaktadır. Oksidatif denge devam ettiği sürece organizma oksidatif stresten etkilenmemektedir. (Akkuş, 1995).



Şekil 2.1. Antioksidan-serbest radikal dengesi

### 2.2.1. Serbest radikal nedir?

Serbest radikaller bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron içeren ve bu nedenle serbest olarak hareket edebilen, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin atom veya moleküllerdir (Abdollahi ve ark., 2003; Abdollahi ve ark., 2004; Dilsiz, 2009). Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Ortaklanmamış elektron, genel olarak üst kısma yazılan bir nokta ile gösterilir (Akkuş, 1995).

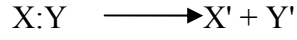
### 2.2.2. Serbest Radikaller Nasıl Oluşur?

Serbest radikaller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de toksik maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir (Cross, 1987). Serbest radikal yaratan kaynaklar radyasyon, virüsler, güneş ışınlarının bir kısmı olan ultraviyole ışınları, hava kirliliğini yaratan fosil kökenli yakıtların yanma sonundaki ürünleri, sigara dumanı, enfeksiyon, stres, yağ metabolizması sonunda çıkan ürünler gibi hücre metabolizmasının toksik ürünleri, bazı tahrip edici kimyasallar, haşere kontrol ilaçları ve birçok başka etkenlerdir. Yani içinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır, hücresel koşullarda da ciddi bir miktar ve çeşitlilikte radikal üretilmektedir (Hurst ve ark, 1997; Jornot ve ark, 1998; Mills ve ark, 1998).

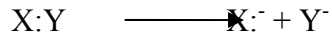
Serbest radikaller 3 yolla meydana gelirler:



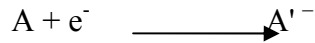
**1. Homolitik bölünme:** Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronların birisinin kalması şeklindeki bölünme.



**2. Heterolitik Bölünme:** Normal bir molekülden bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesidir. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektronlar atomlardan birisinde kalır. Böylece serbest radikaller değil iyonlar meydana gelir.



**3. Normal bir moleküle tek bir elektron eklenmesi:** Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral, organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler.  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  metallerinde ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (Halliwell, 1991; Akkuş, 1995).



Serbest radikal reaksiyonları, normal metabolik yolların işleyişlerinin doğal bir sonucudur. Oksidan moleküller organizmada başlıca glikozun oksidasyonu olmak üzere tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırası ve sonrasında sürekli bir oluşum halindedir. Endojen antioksidanlar adı verilen moleküller tarafından sürekli etkisizleştirme süreci içerisinde. Bu oluşum ve etkisizleştirme olayları organizmalarda bir denge halindedir (Şekil 2.1.) (Halliwell, 1996; Akkuş, 1995).

Serbest radikal molekülleri, belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyöz ajanlara karşı savunmasındaki önemli molekülleridir. Ancak, serbest radikaller belirli düzeyin üzerinde oluşur ve antioksidanlar yetersiz kalırsa söz konusu serbest radikaller hücrenin yapı elemanları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimlerin yapılarını bozarak zararlı etkilere yol açarlar (Tamer ve ark. 2000). Bunlardan özellikle lipitler, serbest radikal hasarına karşı en hassas yapılardır. Serbest radikaller yağ

asitlerindeki doymamış bağlarla kolayca reaksiyona girerek lipidlerin peroksidasyonuna neden olurlar (Bruckdorfer, 1987; Salim, 1993).

Radikal moleküller, antioksidan savunma gücü ile dinamik bir denge içinde bulunduğu sürece organizma için yararlıdır. Örneğin; fagositik hücreler tarafından mikroorganizmaların öldürülmesinin ana mekanizması serbest radikal üretimidir. Serbest radikaller apoptozisin tetikleyicisi, habercisi ve efektörü olarak görev yaparlar. Bu şekilde; aşırı hücre proliferasyonunu önleyerek homeostaziste yer alırlar. Serbest radikaller ikinci haberci olup, transkripsiyon faktörlerini aktive ederler. Hücreler arası haberleşmede görev alırlar. Hücrenin büyümesini sağlayan olayları düzenlerler. Sitozolda ve mitokondride üretilen serbest oksijen radikali, protein sistein kalıntılarının redoksunu düzenleyerek proteinlerin yapı ve işlevinin düzenlenmesinde rol oynarlar. Serbest oksijen radikalleri üretimi ve antioksidatif savunma mekanizması arasındaki denge bozulduğunda, serbest oksijen radikalleri düzeyi artar. Radyasyon, oksijen toksisitesi, postiskemik reperfüzyon hasarı, enfeksiyonlar, enflamasyonlar yanı sıra yaşlanma ile ilgili hastalıklardan katarakt, ateroskleroz, karsinogenez, diyabet ve nörolojik hastalıklar serbest oksijen radikallerinin üretimini artırır (Halliwell, 1989; Halliwell, 1991; Erden, 1992; Uysal, 1998).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir. Serbest oksijen metabolizmasındaki anahtar maddeler şunlardır:

- a. Oksijenin kendisi ( $O_2$ )
- b. Süperoksit radikali ( $O_2^-$ )
- c. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )
- d. Hidroksil radikali ( $OH^-$ )
- e. Geçiş metallerinin iyonları ( $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Mn^{+2}$  vb. )

**a. Singlet Oksijen ( $^1O_2$ ):** Oksijenin elektronlarından birinin kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer değiştirmesi ile oluşur.

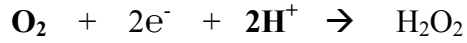
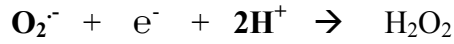
Singlet oksijen, ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen türüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olabilir (Akkuş, 1995).

**b. Süperoksit Radikali:** Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikal anyonu ( $O_2^-$ ) meydana gelir (Akkuş, 1995).



Süperoksit bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit düşük pH değerinde daha reaktiftir (Akkuş, 1995)

**c. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ):** Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden  $2 e^-$  alması ve ya süperoksidin bir  $e^-$  alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki H atomuyla birleşerek hidrojen peroksidi meydana getirir.  $H_2O_2$  membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır (Akkuş, 1995).



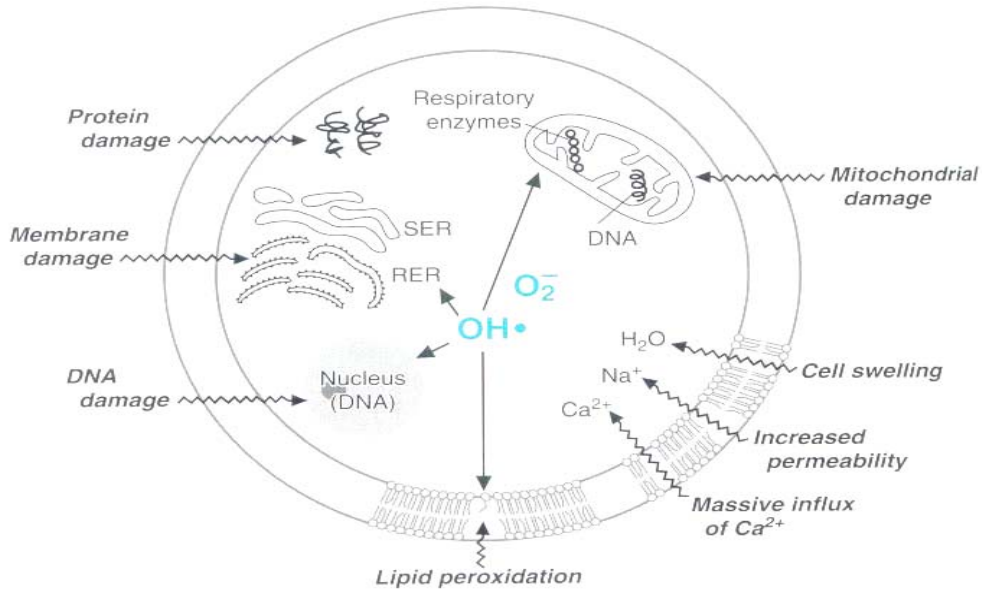
Hidrojen peroksit bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, kolaylıkla en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikaline ( $OH$ ) yıkılabilir (Akkuş, 1995).

**d. Hidroksil Radikali ( $OH$ ):** Hidroksil radikali, ya  $H_2O_2$ 'nin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesi (Fenton Reaksiyonu) ile ya da suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucu meydana gelir. Son derece reaktif bir radikaldir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştugu yerde büyük hasara sebep olur. Tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına sebep olur (Akkuş, 1995).

**e. Geçiş metallerinin iyonları:** Serbest radikaller elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötral, organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler.  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  metallerinde ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (Halliwell, 1991; Akkuş, 1995).

### 2.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri Nelerdir?

Serbest radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştuğu zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Mitokondrial, endoplazmik ve nükleer elektron transport sistemlerinde (sitokrom p450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında bol miktarda serbest radikal üretilir. Bir anlamda serbest radikaller, solunum ve sindirim gibi normal vücut faaliyetlerinin zehirli atıkları durumundadır. Araştırmacılar, insan vücudundaki her hücrenin günde ortalama 10.000 serbest radikal hücumuna uğradığını belirtmektedirler. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezse; hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürebilir, membran lipit ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engelleyebilir, nükleustaki DNA'ya etki edip, DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirebilir, bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlayabilir, yaşlanma ve kanser gibi olaylara neden olabilirler (Akkuş, 1995; Dündar ve Aslan, 2000).



Şekil 2.2: Serbest radikallerin etkileri.

#### 2.2.3.1. Serbest Radikallerin Yağlara Etkileri (Lipit Peroksidasyonu)

Biyomoleküllerin tüm büyük sınırları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipitler en hassas olanlarıdır. Hücre membranı, bol miktarda doymamış yağ asidi içerdiğinden serbest radikal hasarına oldukça duyarlıdır (Halliwell, 1989). Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (Akkuş, 1995). Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü olay, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipit peroksidasyonu sonucu meydana gelen hasar geri dönüşümsüzdür (Akkuş, 1995).

Lipit peroksidasyonu, bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asidi zincirinden bir  $H^+$  uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asiti zinciri bir lipit radikali niteliği kazanır. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipit radikalının moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipit peroksil radikali meydana gelir. Lipit peroksil radikalleri membran yapısındaki dipol poliansatüre yağ asitlerini de etkileyerek yeni lipit radikallerin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder (Akkuş, 1995).

Lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur (Akkuş, 1995).

Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri gibi maddeler hücrenin birçok komponentiyle reaksiyona girerek hücrenel ve metabolik fonksiyonlar üzerine toksik etki gösterirler (Köse ve Doğan, 1992).

Plazma membranı ve organel lipit peroksidasyonu, serbest radikal kaynaklarının hepsiyle stimüle edilebilir ve metallerin varlığında artar (Akkuş, 1995). Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonundan malondialdehit (MDA) meydana gelir. MDA membran komponentlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açarak iyon transportu, enzim

aktivitesi ve hücre yüzey determinantlarının bazı özelliklerini değiştirmektedir (Köse ve Doğan, 1992).

Lipit peroksidasyonu ya toplayıcı etki ile sonlandırılır, ya da otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder (Akkuş, 1995).

### 2.2.3.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Protein oksidasyonu, hidroksil radikali (OH<sup>·</sup>) ve hidrojen peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) ile direkt olarak veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu indirekt olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır.

Reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olan tüm reaksiyonlar ve ajanlar protein oksidasyonuna yol açabilmektedir. Proteinlerin radikal aracılı hasarı; elektron kaybı, metal-iyon katalizli reaksiyonlar, lipit ve şekerlerin otooksidasyonu ile başlatılabilmektedir. Bu ürünlerin oluşum hızının artması veya temizleyici mekanizmaların yetersiz kalması, proteinler de dahil olmak üzere diğer hücresel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artışına yol açar.

Proteinler serbest radikal etkilerine karşı, yağlardan daha az hassastırlar ve başlayan zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır (Akkuş,1995). Protein fonksiyonu için kritik pozisyonda olan aminoasitler (örneğin enzimin aktif bölgesindeki amino asitler), özellikle radikal hasarına duyarlıdırlar. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril (-SH) grubu bulunduran amino asitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik amino asitler, oksidasyona en fazla maruz kalanlardır (İşlekel ve ark., 2000) Özellikle sülfür radikali ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucu immünoglobulin G ve albümin gibi çok sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapısı bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (Akkuş,1995).

Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri,

özellikle serbest radikallerin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücrel ve membran fonksiyonları bozulmaktadır. (İşlekel ve ark. 2000).

#### **2.2.3.2.1. Protein Oksidasyonu Türleri:**

Proteinler birçok farklı mekanizma ile okside olabildiklerinden birden fazla protein oksidasyon türü vardır. Proteinlerin oksidatif modifikasyonları için genel kabul gören bir sınıflandırma şeması yoktur. Ancak proteinlerin oksidatif modifikasyonu oksitlenen amino asidin ve oluşan ürünün özelliğine göre iki gruba ayrılabilir:

##### **a) Global Modifikasyon:**

Birden çok amino asidin değiştiği ve birden çok ürünün oluştuğu modifikasyonlardır. Pro, Arg, Lys, Thr, amino asitlerinin yan zincirlerinin, 4-hidroksi-2-nonenal ile reaksiyonu sonucunda oluşan karbonil grupları (PCO) örnek olarak gösterilebilir.

##### **b) Spesifik Modifikasyon:**

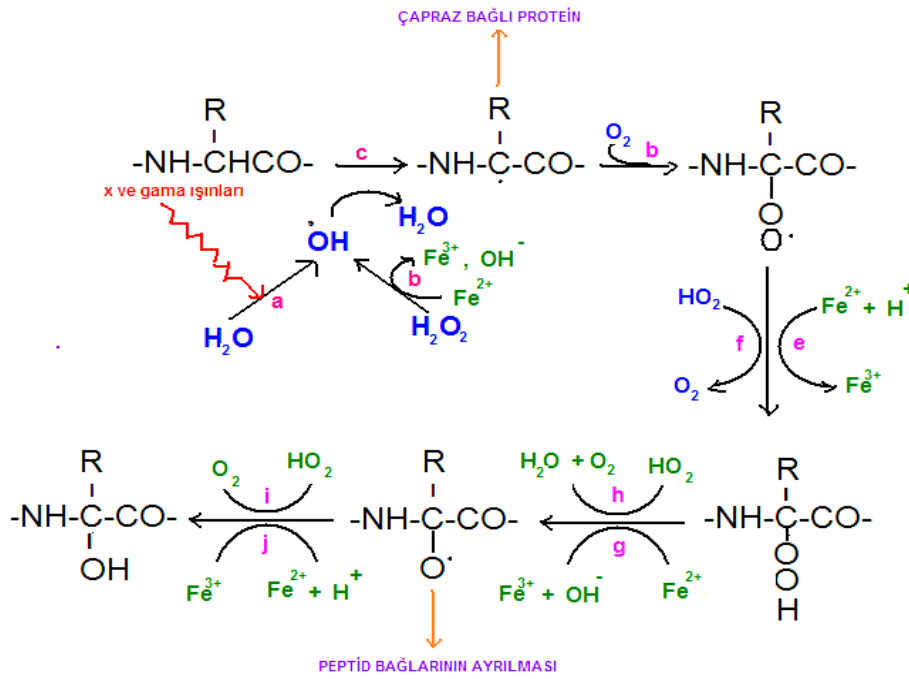
Hem oksitlenen amino asidin hem de oluşan ürünün oldukça spesifik olduğu modifikasyonlardır. Tirozinin ditirozine dönüşümü bu tip modifikasyonun bir örneğidir. Spesifik modifikasyonlar risk açısından değerlendirildiğinde; global modifikasyonlara göre protein molekülünün daha küçük bir kısmında etkili olması nedeniyle protein fonksiyonları için daha az risk taşır.

#### **2.2.3.2.2. Protein Oksidasyonunun Mekanizmaları:**

Pek çok sayıda mekanizmanın protein oksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar; protein karbonil (PCO) oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol (P-SH) gruplarının kaybı, 3- nitrotirozin (3-NT), ditirozin (diTyr), oluşumu olarak sıralanabilir.

### a) Protein Karbonil Türevlerinin (PCO) Oluşumu:

PCO türevlerinin oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları amino asitlerin  $\alpha$ -karbon atomlarının veya R yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonlarından ve bu modifikasyonları takiben meydana gelen reaktif oksijen aracılı peptit ayrılması reaksiyonundan oluşmaktadır. Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit bakiyesinde ve/veya proteinlerin peptid omurgasında oluşan oksidatif hasara bağlı olarak PCO düzeyleri meydana gelir. PCO düzeylerinin saptanması protein oksidasyonunu belirlemede duyarlı ve genel olarak kabul görmüş bir yöntemdir.



Şekil 2.3: Protein karbonil oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları

ROS ile protein ana yapısının reaksiyonu amino asit  $\alpha$  karbonundan bir H atomunun  $\text{OH}\cdot$ 'a bağanarak ayrılması ve  $\text{H}_2\text{O}$  oluşturması ile başlar. Polipeptit omurgasındaki  $\alpha$ -karbon atomundan  $\text{OH}\cdot$  radikali ile  $\alpha$ -hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda amino asit bakiyesi karbon merkezli radikal haline dönüşür (Şekil 2.3., Reaksiyon c). Bu reaksiyona yol açan  $\text{OH}\cdot$  radikali suyun radyolizinden (x ve  $\gamma$  ışınlarıyla) veya  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin metal katalizli yıkımından



açığa çıkar (reaksiyon a ve b). Oluşan karbon merkezli radikal moleküler oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyonlaşarak (reaksiyon d) daha sonra alkilperoksidi verecek olan alkilperoksil radikal ara ürününü oluşturur. Alkilperoksit, alkoksil radikali (reaksiyon h) üzerinden hidroksi protein türevini verir (reaksiyon j). Reaksiyon basamaklarının pek çoğunda  $Fe^{++}$  ve  $Cu^{+}$  varlığında  $HO_2^{\cdot}$  ile etkileşim önem taşır (reaksiyon e,g,i ). Bu metabolik yolda oluşan alkil, alkilperoksil ve alkoksil radikal ara ürünleri aynı veya farklı protein molekülündeki R yan zincirleri ile yan reaksiyonlar ile etkileşerek yeni karbon merkezli radikallerin oluşumuna yol açar. Oluşan bu yeni karbon merkezli radikaller ile yukarıdaki reaksiyonlar tekrarlanır. Oksijen yokluğunda (reaksiyon d) gerçekleşmez. Oluşan karbon merkezli radikal diğer bir karbon merkezli radikal ile etkileşerek protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna yol açar (Şekil 2.3) (Evans ve ark., 1999).

Alkoksil radikalinin oluşumu (Şekil 2.3., Reaksiyon h ve g) peptit bağının diamit veya  $\alpha$ -amidasyon metabolik yolları ile ayrılmasına neden olur (Evans ve ark., 1999).

Diamit metabolik yoluyla ayrılma sonucunda, diamid ve izosiyanat yapısı,  $\alpha$ -amidasyon metabolik yolunda ise amid ve N- $\alpha$ -ketoaçil yapısına sahip peptid fragmentleri oluşur (Evans ve ark., 1999).

Diamit ve  $\alpha$ -amidasyon metabolik yolları dışında polipeptid zincirinin serbest radikal aracılı ayrılması; prolil, glutamil ve aspartil bakiyelerinin oksidasyonu ile de gerçekleşebilmektedir (Evans ve ark., 1999).

PCO oluşumuna yol açan sekonder modifikasyon reaksiyonları ise; proteinlerin karbonhidrat ve lipit ürünleri ile reaksiyonlarını içermektedir. Lipit peroksidasyonu sırasında oluşan aldehitler, indirgen şekerler veya bu şekerlerin oksidasyon ürünlerinin proteinlerdeki lizin bakiyeleri ile reaksiyonu sonucu oluşan reaktif karbonil türevleri protein yapısına karbonil gruplarının katılmasına yol açar (Evans ve ark., 1999).

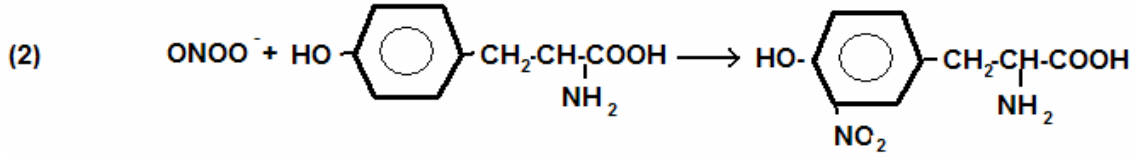
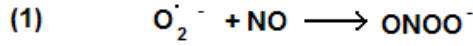
Proteinlerin PCO içeriği oksidatif stresin rol aldığı çeşitli patolojik durumlarda önemli ölçüde artmaktadır. Çeşitli patolojik beyin dokusu örneklerinde PCO düzeyleri 8 nmol/mg protein düzeyine kadar çıktığı bildirilmiştir (Evans ve ark., 1999).

**b) Tiyol (-SH) Gruplarının Oksidasyonu:**

Serbest radikallerin proteinlerdeki tiyol gruplarının oksidasyonuna yol açtığı birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir. Sistein amino asitinin –SH grubu oksidatif atağa oldukça yatkındır. Bu nedenle –SH gruplarından değişik mekanizmalarla oluşan tiyol radikali (-S) proteinlerdeki disülfid bağlarının oluşumuna öncülük eder. –SH gruplarının disülfidlere ve oksiasit gibi diğer oksitlenmiş türevlere dönüşümü, radikal aracılı protein oksidasyonunun en erken gözlenen belirtisidir (Dean ve ark.). Birçok araştırmacı elektron paramanyetik rezonans (EPR) tekniğini kullanarak peroksinitritin tiyol grupları ile reaksiyonu sonucu tiyol radikallerinin oluştuğunu göstermiştir. Tiyol gruplarının bir başka oksidasyon şekli ise 4-hidroksinonenal'in, proteinlerdeki –SH gruplarına geri dönüşümlü bir reaksiyon olan Michael reaksiyonu sonucunda tioeter bağı ile bağlanmasıyla gerçekleşmektedir (Dean ve ark., 1998; Berlett, 1997; Çakatay, 2004).

**c) Nitrotirozin (NT) Oluşumu:**

NT oluşumu protein oksidasyonuna yol açan bir başka moleküler mekanizmadır (reaksiyon 1 ve 2). Peroksinitrit (ONOO-), nitrik oksidin (NO), O<sub>2</sub><sup>-</sup> ile in vivo reaksiyonu sonucunda oluşan sitotoksik bir türevidir. Süperoksit ve nitrik oksit radikallerinin peroksinitrite göre nispeten daha dayanıklı olmalarına karşılık, peroksinitrit daha reaktif bir türevidir. Normal koşullarda, süperoksit dismutaz, oluşan tüm süperoksit radikallerini dismutasyona uğratmaya yetecek düzeydedir, fakat, süperoksit düzeyleri çok artmışsa ya da fazla miktarda NO radikali meydana gelmişse peroksinitrit oluşur. Peroksinitrit oluşumu oksidatif protein hasarının hem ortaya çıkışına, hem de ilerlemesine sebep olmaktadır. ONOO<sup>-</sup>'in proteinler üzerine atağının ana ürünü tirozinin *orto* pozisyonunda nitrolanmasıdır, bu da NT oluşumuna yol açar (Çakatay, 2004).



Şekil 2.3: NT reaksiyonları

NT,  $\text{ONOO}^-$ 'nin in vivo spesifik bir marker'ıdır.  $\text{ONOO}^-$ ; DNA'yı, enzimleri, proteinleri, lipitleri ve tiyol gruplarını okside edebilmesinden dolayı yüksek toksisiteye sahiptir (Çakatay, 2004).

#### d) İleri Oksidasyon Ürünlerinin (AOPP) Oluşumu:

AOPP (Advanced Oxidation Protein Products), ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Diğer taraftan AOPP'nin yapısal olarak ileri glikasyon son ürünlerine benzediği bildirilmektedir. AOPP protein oksidasyonunun derecesini belirlemede duyarlı bir referans (marker)'dır. Witko-Sarsat ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, AOPP düzeylerinin, protein oksidasyonunun göstergesi olan plazma ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile korelasyon gösterdiği, fakat lipit peroksidasyon marker'ı olan tiyobarbütirik asit ile reaksiyonlaşan maddelerle korelasyon göstermediği bildirilmiştir (Çakatay, 2004).

#### e) Protein Karbonillenmesi

Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir (Shacter, 2000). Reaktif oksijen türevleri (ROS), direkt olarak proteinler üzerine etki ederek oksidize aminoasitlerin oluşumuna yol açtıkları gibi, indirekt yolla karbonhidrat ve lipidlerin otooksidasyonu sonucu ortaya çıkan reaktif karbonil bileşiklerinin etkisi ile de ileri glikasyon son ürünlerine ve ileri lipoksidasyon son ürünlere dönüşürler (Miyata ve ark., 1999). Karbonhidratların ve askorbatın otooksidasyonu sonucu gliksal, arabinoz, glikolaldehid, 3-deoksiglukozon ve

dehidroaskorbat gibi karbonil grubu içeren ara bileşikler meydana gelir (Inagi ve Miyara, 1999). Reaktif karbonil bileşikleri non enzimatik olarak proteinlerin amino gruplarına bağlanarak schiff-base ürünleri oluşturur. Bu geri dönüşümlü form daha sonra daha stabil olan ve Amadori ürünleri adı verilen forma dönüşür (Çakatay, 2004).

Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitesindeki artış olarak sıralanabilir (Davies ve ark., 1999; Shacter, 2000). Protein oksidasyonuna yol açan ana mekanizmanın polipeptid omurgasındaki çeşitli amino asitlerin  $\alpha$ -karbon atomlarından OH $\cdot$  (hidroksil) radikalinin etkisiyle hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda başladığını saptamışlardır (Swallow, 1960; Garrison ve ark., 1962; Schuessler ve Schilling, 1984). Protein oksidasyonunun protein karbonil (PCO) gibi markerlarının *in vivo* protein oksidasyonunun derecesini gösterecek bir araç olarak kullanılması ise nispeten daha uzun bir geçmişe dayanmaktadır (Stadtman, 1988; Stadtman ve Levine, 2003.).

### 2.2.3.2.3. Protein Oksidasyonu ile İlgili Hastalıklar:

Son yıllarda yapılan çalışmalarda hastalıkların ilerlemesi ile protein oksidasyonu arasında kuvvetli bir ilişki olduğu belirtilmekte fakat pek çok hastalıkta, oksidatif stresin bir sebep mi yoksa primer hastalık sürecinin bir sonucu mu olduğu açık değildir. Diğer yandan, protein oksidasyonu, protein fonksiyon bozukluğu ve hastalıklar arasındaki ilişkiler de büyük ölçüde açığa kavuşmamıştır. Bununla birlikte enzimlerin ve yapısal proteinlerin oksidatif modifikasyonlarının hastalıkların etyolojisinde önemli rol oynadığı/oyunabileceği kesinlik kazanmıştır.

Protein oksidasyonu ile ilişkili hastalıklar ve ilgili modifikasyonlar özet olarak çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1: Protein oksidayonu ile ilişkili hastalıklar ve oksidatif modifikasyonları

Hastalık	Oksidatif modifikasyon tipi
Alzheimer hastalığı	PCO, 3-NT, diTyr
Amiyotrofik lateral skleroz	PCO, 3-NT, diTyr
Diyabet	PCO, P-SH
Katarakt oluşumu	PCO
Koroner kalp hastalığı	PCO
Kronik akciğer hastalığı	PCO
Kronik böbrek yetmezliği/üremi	PCO, P-SH, Klorotirozin
Kronik hepatit C	PCO
Kistik fibroz	PCO
Mesane kanseri	PCO
Parkinson hastalığı	PCO, 3-NT
Polikistik over hastalığı	PCO

**-Alzheimer:**

Alzheimer hastalığının patolojisinde protein oksidasyonu, lipit peroksidasyonu ve ROS'un oluşumu ile etkili olan oksidatif stresin varlığı kesin bir şekilde gösterilmiştir (Dalle-Done ve ark., 2003). Oksidatif stresin, Alzheimer hastalığında primer mi yoksa sekonder bir olay olduğu kesin olmasa da, nöral kayba yol açan önemli bir nörodejeneratif faktör olduğu açıkça gösterilmiştir (Buterfield ve ark., 2002). Dalle-Done ve arkadaşları, yaşlanmış beyinde oldukça sık görülen oksidatif hasarın, Alzheimer hastalarında daha şiddetli görüldüğünü bildirmişlerdir.

Alzheimer hastalığında PCO düzeylerinin hipokampus ve inferiör parietal lobulde arttığı, az dejeneratif özellik gösteren serebellumda ise değişmediği Hansley ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir.

**-Diyabet:**

Diyabet, kronik metabolik bir bozukluk olmakla birlikte aynı zamanda artmış bir oksidatif stres durumudur. Diyabette oksidan/antioksidan arasındaki dengesizliğe bağlı olarak

görülen sistemik oksidatif stres PCO düzeyinde artışa yol açar. PCO düzeyindeki artışın hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabette görüldüğü bildirilmektedir (Akkuş, 1995).

Yapılan çalışmalarda komplikasyonsuz diyabetik çocuklar ve adolesanlarda kontrol grupları karşılaştırıldığında plazma PCO düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmektedir. Bu durum oksidatif protein hasarının diyabetin erken dönemlerinde başladığını ve ileriki evrelerde arttığını göstermektedir (Çakatay, 2004).

### **-Parkinson Hastalığı:**

Alzheimer'den sonra ikinci en sık rastlanılan nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığında; substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların kaybına bağlı olarak ilerleyici özellikte hareket bozukluğu görülür.

Parkinson hastalığında tüm beyin bölgelerinde PCO düzeylerinde artış görüldüğü bildirilmiştir (Alam ve ark., 1997).

### **-Yaşlanma:**

Yaşlanmayla ilgili olarak öne sürülen teorilerden biri de serbest radikaller teorisi. Araştırmacılar, canlının yaşamı boyunca etkilendiği ROS'un oksidatif hasara neden olabileceğini ileri sürmektedir. Kümülatif ve potansiyel olarak artan miktardaki hasar, yaşlanmadaki fonksiyonel ve patolojik bozukluklara yol açar (Butterfield ve ark., 2001)

Proteinlerde *in vivo* olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler, proteinlerin rol aldığı çeşitli hücresel fonksiyonları etkiler. Reseptörlerin sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport sistemlerinin ve enzimlerin rol aldığı hücresel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenir.

Garcia-Arumi ve arkadaşlarının (1998) lenfositlerle yaptığı bir çalışmada; yaşlı bireylerin antioksidan savunma mekanizmalarında yaşla azalma görülmediğini, buna karşılık PCO düzeylerindeki artışa bağlı olarak oksidatif protein hasarında artış görüldüğü bildirilmiştir.

Çakatay ve arkadaşları (2000); yaşlı, genç erişkin ve erişkin grupları üzerinde plazma proteinleriyle yaptığı bir çalışmada; yaşlı grubun plazma PCO düzeylerinin genç erişkin ve erişkinlere göre anlamlı derecede yüksek; P-SH düzeylerinin anlamlı derecede düşük bulduklarını bildirmekte ve bu durumu yaşlanmayla plazma proteinlerinde ortaya çıkan oksidatif protein hasarıyla ilişkili olduğunu ileri sürmektedirler.

### **2.2.3.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri**

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoalaldehitler meydana gelir. Okzoalaldehitler, DNA, RNA, ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliğinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (Akkuş, 1995). Karbohidratların proteinlere bağlanması, proteinleri serbest radikal hasarına daha duyarlı kılmaktadır. Böylece hormonal ve nörotransmitter yanıtlarda rol oynayan hücre reseptör işlevleri değişmektedir (Winrow, ve ark. 1993; Aybey, ve ark. 1996).

### **2.2.3.4. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri**

Reaktif oksijen radikallerinin, hücrede saldırdığı bir diğer önemli makro molekül nükleik asitlerdir. Kalıtsal bilgiyi taşıyan deoksiribonükleik asidin (DNA) temel taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan pürin ve pirimidin bazları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Hidroksil radikali, nükleotidin yapısını oluşturan deoksiriboz ve baz molekülleri ile reaksiyona girerek yapısal değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membrandan kolaylıkla geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre difonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA, serbest radikallerden kolay zarar görebilen önemli bir hedeftir. Özellikle guanin bazının radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (Özekin ve Değer, 2001).

## 2.3. Antioksidanlar

### 2.3.1. Antioksidan nedir?

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar ‘antioksidan savunma sistemleri’ veya kısaca ‘antioksidanlar’ olarak bilinen; serbest radikalleri nötralize eden, serbest radikal hasarlarını tamir etmeye yardımcı olan ve vücudun onlardan etkilenmesini minimize eden veya kendini yenilemesini sağlayan moleküllerdir (Ames ve ark. 1993; Müftüoğlu, 2003).

### 2.3.2. Antioksidanlar Nasıl Etki Ederler?

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler.

**-Toplayıcı (scavenging) Etki:** Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler, trakeo-bronşial mukus ve küçük moleküller bu tip bir etki gösterirler (Akkuş,1995).

**-Bastırıcı (quencher) Etki:** Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki adı verilir. Vitaminler, flavanoidler, trimetazidin ve antosiyanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler (Akkuş, 1995).

**-Onarıcı (repair) Etki:** Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar (Benzer ve Ozan, 2003).

**-Zincir Kırıcı (Chain Breaking) Etki:** Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler ( Akkuş, 1995).



### 2.3.3. Antioksidan Çeşitleri

Antioksidanlar, endojen (doğal kaynaklı) ve eksojen antioksidanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılır (Akkuş, 1995):

#### a) Endojen (Doğal Kaynaklı) Antioksidanlar:

-Enzimler: Katalaz, Süperoksit Dismutaz, Glutasyon Peroksidaz

-Enzim olmayanlar: Redükte Glutasyon (GSH),  $\beta$ -karoten, E vitamini, Askorbik asit, sistein, albumin, bilirubin, hemoglobin v.s.

#### b) Eksojen antioksidanlar:

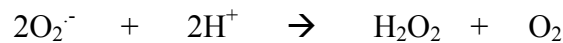
-Ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri (Akkuş, 1995; Dündar ve Aslan, 2000).

**-Katalaz:** Katalaz; dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalar. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak bu enzim, bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici bir substrat olarak diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir (Akkuş, 1995). Esas olarak peroksizomlarda, daha az sitozolde ve mikrozomal fraksiyonlarda bulunur (Altınışık, 2000).



Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksid ve metil-etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksidlere etki etmez (Akkuş, 1995).

**-Süperoksit Dismutaz (SOD):** İlk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, süperoksidin hidrojen peroksid ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler.

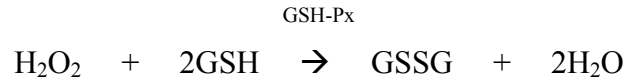


İnsanda SOD'un iki tipi bulunmaktadır:

- Sitozolde bulunan Bakır (Cu) ve Çinko (Zn) içeren: (Cu-Zn SOD)
- Mitokondride bulunan Tetramerik Manganez (Mn) içeren: (MnSOD)

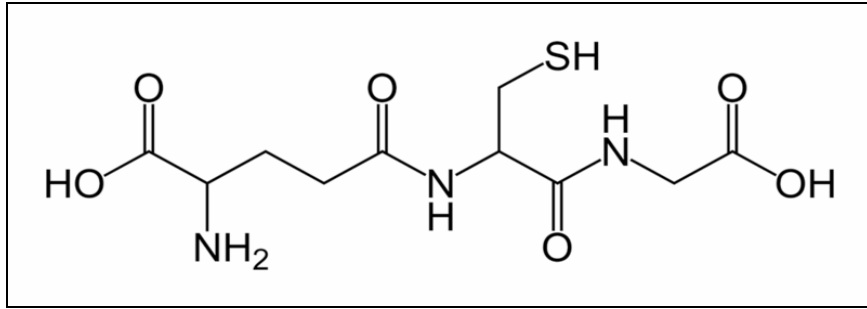
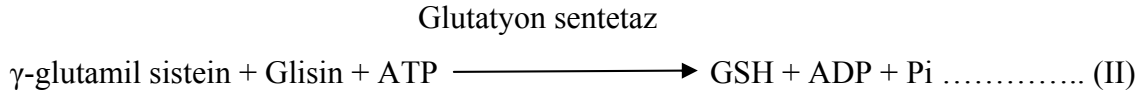
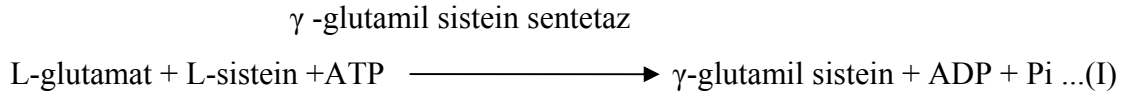
SOD aktivitesi oksijen kullanımı olan dokularda fazladır. Normal koşullarda metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intraselüler süperoksit düzeyi sabit tutulur. SOD'un ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür (Akkuş, 1995).

**-Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px):** Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Dört selenyum atomu içeren tetramerik bir enzimdir. Sitozolde bulunur. GSH-Px, aşağıdaki reaksiyonları katalizler (Akkuş, 1995; Altınışık, 2000):



**-Redükte Glutasyon (GSH):** Vücutta enzimatik olmayan önemli bir antioksidan olan redükte glutasyon (GSH), serbest radikaller ve peroksidlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur (Beutler ve Duron, 1963; Akkuş, 1996; Fırat, 1997; Dikici, 1999; Yanbeyi, 1999). En önemli görevi, enzim ve proteinlerin tiyol gruplarının (-SH) indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli düzeylerde kontrolünü sağlamaktır. Tiyol grubuna sahip birçok enzim düşük hızda fakat okside olarak ya da O<sub>2</sub>'nin direkt etkisiyle hızla aktivitesini yitirirler. İşte GSH kendisi okside olup tiyol gruplarını tekrar indirgeyerek bunların aktivasyonunu sağlar (Calberg ve Mannervik, 1985; Akkuş, 1996; Yanbeyi, 1999).

GSH; glutamik asit, sistein ve glisin içeren bir tripeptit olup, aktif bir sülfidril (-SH) grubuna sahiptir. GSH'nin büyük bölümü karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç duyulmadan iki aşamada sentezlenebilir (Beutler ve Duron, 1963; Akkuş, 1996; Fırat, 1997; Champe, 1997; Dikici, 1999; Yanbeyi, 1999).



Şekil:2.5. Glutasyon'un Molekül Yapısı ([hawaiiimana.com/products/glutathione.shtml](http://hawaiiimana.com/products/glutathione.shtml)).

## 2.4. Apoptozis

Apoptoz, eski Yunanca “APO” (ayrı) ve “PTOZIS” (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ve Homeros tarafından ‘sonbaharda yaprak dökümünü’ tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür. Bu nedenle bazı hücrelerin sonbahar yaprakları gibi adeta kuruyarak vücudu terk etmesi ve arkadan gelen hücrelere yer açmasıyla gerçekleşen hücre ölüm tipi, Klasik Yunan tarihçisi James Cormack’ın önerisiyle “apoptoz” olarak adlandırılmıştır (Cummings ve ark., 1997).

Her hücre, doğar, büyür, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürer. Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (Erdoğan, 2003; Hıkım ve ark. 1995). Son yıllarda, bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogeneğinde rol aldığı gösterilmiştir (Mcphie ve ark. 2003). Örneğin; artmış proliferasyon ve azalmış apoptozisin karsinogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir (Kerr, 1994).

Apoptozis, programlanmış hücre ölümü, organizmada fizyolojik süreçlerin yanı sıra çeşitli patolojilerin ortaya çıkışındaki mekanizmalarda da rol oynamaktadır. Tek bir hücre, çoğalarak çok hücreli organizmaya dönüşürken organizma için zararlı olabilecek bir takım mutasyonlu hücreler ve yanlış yere yerleşen hücrelerin yok edilmesi gerekir. Bu işlem için bir program dahilinde sinyaller devreye girer. Kansere, diyabete, AIDS, iskemi gibi hastalıkların başlangıcında apoptozis sonucu aşırı vezikül artışı olduğundan immün sistem bunları yok etmede yetersiz kalabilir ve sonuçta apoptozis mekanizması belli bir aşamadan sonra işleyemez hale gelir. Böylece patolojik durumlar ortaya çıkar (Dilsiz, 2009).

Apoptozisin düzenli olmadığı durumlarda tümörögenenezis ve sonuçta kanser oluşur. Ayrıca enfeksiyon ajanı bir kısım virüsler apoptozisi engelleyerek etkili olurlar. Deneysel çalışmalarda nitrik oksit (NO) ilave edildiği ortamlarda hücrede apoptozisin engellendiği görülmüştür (Dilsiz, 2009).

### **2.5. Beyin, Apoptozis ve Yaşlanma:**

Beyin dokusu nekroz ve apoptozis yolu ile dejenerasyona uğrar. Nekroz bir yaralanmayı takip eder ve hücre lizisi, şişmesini içerir; bu yolla hücre içerikleri ekstrasellüler bölgeye dökülür. Glial proliferasyonu içeren bir inflamatuvar yanıt oluşur. Apoptozis boyunca ise nükleus ve sitoplazma yoğunlaşır ve parçalara ayrılır. Bu parçalar hızlı bir şekilde komşu hücreler ve makrofajlarca fagosit edilir. İnflamatuvar bir süreç ya da gliosis ortaya çıkmaz (Ceylan ve ark., 1999).

Merkezi sinir sisteminin embriyolojik gelişiminde apoptozis, hangi hücre ve nöropillerin (Aksonların ve dendritlerin) yaşayacağını belirlemede önemli rol oynar. Uygun hedef hücrelerine yönelen ve hedef hücrelerden nörotrofinleri alan hücreler güçlenir. Gerekli nörotrofik faktörleri almayan hücrelere uygunsuz yönelmeler programlı bir eliminasyon ile sonlandırılır (Cowan ve ark.1984). Nöronlar ve projeksiyonlarının %50'sinin erken yetişkinlik döneminde apoptozis yolu ile kayb olduğu tahmin edilmektedir (Raff ve ark.1993). Apoptozis organizmanın tüm yaşamı boyunca devam eder (Barde 1994). Hücreler ve nöropiller apoptozis ile elimine edilir ve nöropil rejenerasyonu ile yeniden oluşurlar. Rejenerasyon ve apoptozis dengede olduğu zaman dokular stabildir. Apoptozis arttığında veya rejenerasyonun azaldığında doku kaybı ortaya çıkar (ceylan ve ark., 1999).

## 2.6. Resveratrol:

Bitkilerde çeşitli dış etkenlere karşı savunma maddeleri olarak sentezlenen ikincil metabolit maddelere 'fitoaleksin' (bitki antibiyotiği) adı verilir. Resveratrol bir fitoaleksindir (Evren, 2008; Alkan, 2006).

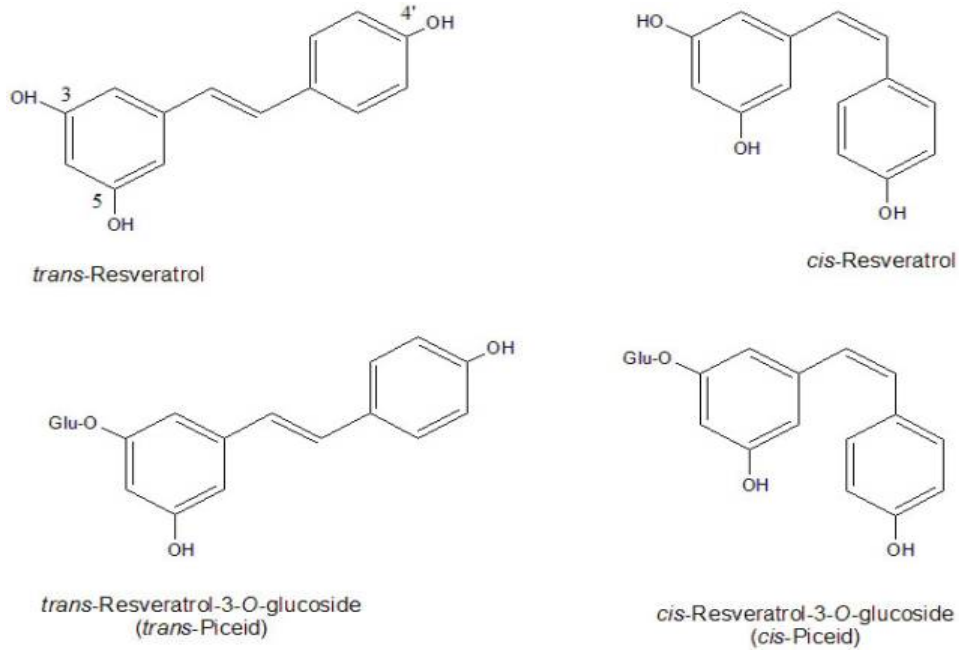
Resveratrol ilk kez 1940 yılında *Veratum grandiflorum* (Çöpleme bitkisi)'un reçinelerinde keşfedilmiştir (Takoako, 1940; Alkan, 2006). Daha sonra Langcake ve ark. (1977) resveratrolün *Vitis vinifera* (Asma)'nın yapraklarında fungal enfeksiyon veya UV ışınlarla tepki olarak sentezlenen bir bileşik olduğunu öne sürmüştür.

Üzümlerde resveratrol miktarı asmanın yetiştirildiği toprak, hava gibi koşullara, *Botrytis cinerea* adı verilen küfle enfekte olmasına ve şarapçılıkta kullanılan yöntemlere bağlı olarak değişebilmektedir. Üzümlerde resveratrol sentezi stres, zedelenme, enfeksiyon ve UV ışınları gibi dış faktörlere bağlı olarak değişim göstermektedir (Cantos ve ark., 2003).

Resveratrol üzüm kabuklarında 5-7 ppm, çekirdeklerinde 1 ppm, etli kısımlarında 0.1 ppm'den azdır (Douillet ve ark., 1999). Kırmızı şaraplarda üzümün kabukları ile birlikte cibre fermentasyonu yapıldığı için kabuklardan geçen resveratrol miktarı ortalama 1-11 ppm kadardır (Soleas, 1997).

### 2.6.1. Resveratrolün Kimyasal Yapısı:

Resveratrol cis ve trans izomer şekillerde bulunur. Ayrıca cis ve trans şeklinde glukosid olarak trans ve cispiceid şeklinde glukoz molekülüne bağlanarak da oluşur (Şekil:2.6). Resveratrol yağ, di metil sülfoksit (DMSO) ve alkolde çözünen bileşiktir. Molekül ağırlığı 228 g/mol, erime sıcaklığı 253-255 °C dir. Kapalı formülü C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub> dür. Şaraplarda trans resveratrol, cis resveratrole göre daha fazladır. Şarap ışık ve oksijen aldığı zaman trans izomerlerin cis izomere dönüştüğü belirlenmiştir (Chen ve ark., 2002). Trans-resveratrolün ve piceidlerinin üzüm suyu ekstratlarında stabilitesi gerek 2 yıl süre ile % 60 nem ve oda sıcaklığında ve gerekse %75 nem ve 40 °C de 4 sene süre ile hızlandırılmış stabilite testleri sonucunda elde edilen veriler resveratrolün stabilitesini koruduğu yönündedir (Prokop ve ark., 2006).



Şekil 2.6:Resveratrolün yapısı

### 2.6.2. Resveratrol Sentezi:

Resveratrol bitkilerde fenil alaninden birkaç basamakta sentezlenir. Fenil alaninden fenilalanin amonya liyaz enzimi ile deaminasyonla cinnamic asit oluşur. Bu bileşik cinnamate 4-hidroksilaz ile 4-coumaric asite dönüşür. 4-coumarat ile Co-A esteri oluşur. Bu ester CoA ligaz' ır. 4-coumaryl Co-A ile 3 malonyl Co -A stilben sentaz enzimi ile resveratrole dönüşür (Wu, 2001).

### 2.6.3. Ekstraksiyon ve Analizi:

Doğal kaynaklardan resveratrolün ekstraksiyonu düşük miktarlarda olması nedeniyle zaman alıcıdır. Resveratrolün ekstraksiyonunun kısa bir sürede denatüre olmadan yapılması gerekir. Son senelerde HPLC GC ile birçok metod geliştirilmiştir. Genellikle HPLC de UV modunda C18 reverse faz kolonu kullanılarak ölçülmektedir. Trans- resveratrol 307 nm, cis-resveratrol ise 280 nm de ölçülmektedir. Bitkilerden resveratrol ekstraksiyonunda genellikle etil veya metil alkol kullanılmaktadır. Yerkıstığı ve ürünlerinde genellikle alkol ekstraksiyonu

sonrasında, elde edilen resveratrol ekstraktı  $Al_2O_3$ :Silikajel 60 R18 kolonundan geçirilip HPLC de ölçülmektedir (Sobolev ve ark., 1995). Çikolata ve kakao liköründe ise önce yağ alınıp, elde edilen ekstrakt etanolde çözüldükten sonra kurutulup alkolde çözülüp HPLC de ölçülmüştür (Christine, 2006).

#### 2.6.4. Resveratrolün Ticari Üretimi:

Resveratrol ticari olarak asmaya alüminyum klorür veya alüminyum sülfat ve UV ışık uygulaması ile üretilmektedir (Cantos, 2000). Genellikle ticari olarak resveratrol içeren hapların eldesinde *Polygonum cuspidatum*'un kurutulmuş kökleri kullanılmıştır. Daha çok Çin, Hindistan ve Japonya'da resveratrol hapları çeşitli firmalar tarafından satılmaktadır (alkan, 2006).

#### 2.6.5. Resveratrolün Biyolojik Etkileri:

Sadece son birkaç yılda resveratrol üzerinde yayınlanmış 200 makale vardır. Bu makalelerin çoğunda resveratrolün antioksidan, kalp damar hastalıkları, kanserin ilerlemesi üzerinde önleyici etkileri incelenmiştir. Resveratrolün etkilerinin tıbbi yönden araştırılması Fransızların kolesterolü yüksek gıdalar almasına karşılık, kalp-damar hastalıkları yüzdesinin düşük olmasını kırmızı şarap tüketimine bağlanmıştır. Buna “Fransız paradoksu” adı verilmektedir (Alkan, 2006).

Bundan sonraki çalışmalar, kırmızı şarabın bileşiminde bulunan maddelerin incelenmesi yönünde olmuştur. Mikroorganizmalara olan etkilerinin araştırılması konusunda yapılan çalışmalara *Botrytis cinerae* enfeksiyonlarını durdurması nedeniyle başlanmıştır. İnsanlarda deri enfeksiyonlarında etkili olan bakteri patojenleri üzerinde etkisi incelenmiş *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ve *Pseudomonas aeruginosa* nın 171-342  $\mu\text{g/ml}$  resveratrolle inhibe olduğu belirtilmiştir. Trichophyton gibi bazı fungus türlerinin de 25-50  $\mu\text{g/ml}$  resveratrolle inhibe olduğu belirtilmiştir (Marion Man, 2002). Ayrıca klinik önemi olan *Neisseria gorrhoeae* ve *Neisseria meningitidis* (Docherty, 2001) ile *Helicobacter pylori* (Mahadi, 2000) gibi bakterilerin büyüme ve gelişimlerini engellediği de belirtilmektedir ve ayrıca *Herpes simplex* replikasyonunu (Docherty, 1999) da engellemektedir. Çeşitli çalışmalar resveratrolün pıhtılaşmayı engellediğini ortaya çıkarmıştır. Kalsiyum konsantrasyonunun hücre içinde artması pıhtı birikiminde önemli rol oynar.

Resveratrol Ca girişini engelleyerek pıhtı birikimini de engeller. Lipid peroksidasyonunu önler. Hücre membranlarını koruyarak canlı hücrelerde oksidatif streslerin etkilerini azaltır (Dobrydneva ve ark., 1999).

### 2.7. Stobadin:

ROS oluşumunu önlemek veya etkilerini azaltmak amacıyla farklı mekanizmalara sahip yapay antioksidan ajanlar geliştirilmektedir. Bunlarda biri de heterosiklik indol türevlerinden pridindol yapısındaki stobadindir (Stolc, 1983; Ayan, 2007).

Stobadinin tek elektron redoks potansiyeli bileşiğın biyolojik sistemlerde etkili bir antioksidan olduğunu düşündürmektedir (Satsko ve ark., 1990). Titrasyon altında stobadin dibazik bir asittir (Bezakova, 1993). Stobadin dipalmitat tuzu suda iyi çözünür ama kimyasal olarak dihidroklorid tuzundan daha stabildir ve oral alım için uygundur (Steenken, 1992).

Bir elektron redoks potansiyeli olması sebebiyle biyolojik sistemlerde iyi bir antioksidandır. Bu özelliğinden dolayı, -SH gruplarının oksidasyonu, aminoasit oksidasyonu ve singlet oksijen oluşumunu engellediğı gibihidroksil, peroksil, alkoksil radikallerini de etkin bir şekilde nötralize eder. Bununla birlikte süperoksit radikaline karşı anlamlı düzeyde koruyucu etkiye sahip değildir (Ayan, 2007). Harova ve arkadaşları (1994), stobadinin ROS temizleyici etkisi olduğunu öne sürmüşlerdir. Stobadin, kalp ve merkezi sinir sistemi üzerinde koruyucu etkilere sahiptir (Ayan, 2007).

Veranda ve ark. (1998) farelerde yaptıkları çalışmada stobadinin DNA'da tamir sürecini hızlandırdığı ve aynı zamanda hidroksil radikallerini (OH•) bağlayarak gama ışını kaynaklı kromozomal anomali gelişimini önlediğı görülmüştür.

Karasu ve arkadaşları (2009) yaptığı bir çalışmada, stobadinin, gliko-oksidatif hasarı inhibe ettiğini, albuminüriyi, enzimüriyi, lipid peroksidasyonu, matriks kollagen çapraz bağlanmasını, plazma kolesterol ve trigliserit düzeylerini, protein karbonilasyonunu ve proteinlerle AGEs etkileşimini azalttığını, farklı dokularda protein tiyol, total tiyol, non-protein tiyol gruplarında iyileşmeye neden olduğunu ve hipergliseminin şiddetini diyabetik deney hayvanlarında azalttığını; stobadin ile tedavi edilen diyabetik deney hayvanlarında,



kalpte kalsiyum birikiminin azaldığını, ortalama kan basıncını düzenlediğini, endotel hasarını önlediğini ve vasküler reaktivitedeki bozuklukları iyileştirdiğini öne sürmektedir. Yine aynı çalışmada stobadinin, kalp, aort, böbrek, beyin, karaciğer, periferik sinirler, vas deferens ve retinayı, diyabetin neden olduğu metabolik, fonksiyonel ve yapısal değişikliklere karşı koruduğu diyabetik komplikasyonların önlenmesi, geciktirilmesi ya da tedavi edilmesi bakımından stobadinin potansiyel terapötik bir ajan olabileceği belirtilmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Deney Hayvanları

##### 3.1.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Gruplandırılması

Çalışmada Harran Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarında yetiştirilen *Oryctolagus cuniculus* (Yeni Zelanda Tavşanı) türü dişi tavşanlar kullanıldı.

Çalışmada sırasıyla genç kontrol grubu  $1000\pm 100$ g (n=3), yaşlı kontrol grubu  $2500\pm 150$ g (n=3), resveratrol grubu  $2500\pm 150$ g (n=5) ve stobadin grubu  $2500\pm 150$ g (n=3) olmak üzere dişi tavşanlar kullanıldı. Bunlar sırasıyla; 1.Grup; genç kontrol (etken madde uygulanmayan 3 aylık genç grup), 2. Grup; kontrol (etken madde uygulanmayan 2 yaş grubu), 3. Grup; kontrol + resveratrol (90 gün boyunca 48 saatte bir 25mg/ml/kg resveratrol uygulanan yaşlı grup) ve 4. Grup; kontrol + stobadin (90 gün boyunca 48 saatte bir 25mg/ml/kg stobadin uygulanan yaşlı grup) olmak üzere düzenlendi.

Çalışma öncesinde, 15 gün boyunca tavşanların yeni kafeslerine adapte olmaları sağlandı. Deneyde kullanılan tavşanlar taze marulla beslendi. Su ise adaptasyon süreci boyunca deney hayvanlarının (n=5+1) günlük su tüketimleri temel alınarak günlük 1000 ml olarak verildi. Havalandırma tertibatı bulunan, sıcaklığı 24°C'de sabit tutulmaya çalışılan ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü sağlanacak şekilde deney ortamı oluşturuldu.

#### 3.2. Deneysel Uygulamalar

Gruplanmaları ve adaptasyon süreci tamamlanan tavşanlar, ebatları 110x135x100cm olan kafeslere alındı.

**1. Grup; genç kontrol grubu (n=3):** Bu gruptaki tavşanlara herhangi bir madde uygulaması yapılmadı. Gruplar arasında oluşabilecek farklılıkları kaldırmak amacıyla bu gruba diğer gruplarla eşit miktarda yem ve su verildi.

**2. Grup; yaşlı kontrol grubu (n=3):** 3 dişi tavşandan oluşan bu grup, deney süresince diğer gruplarla aynı ortamda tutuldu. Gruplar arasında oluşabilecek farklılıkları kaldırmak amacıyla bu gruba diğer gruplarla eşit miktarda yem ve su verildi.

**3. Grup; yaşlı kontrol + resveratrol grubu (n=5):** Bu gruptaki tavşanlara deney süresince 25 mg/ml/kg olacak şekilde DMSO'da çözülen resveratrol gavaj yardımı ile oral yoldan verildi. Bu işlem 90 gün boyunca 48 saatte bir tekrarlandı.

**4. Grup; yaşlı kontrol + stobadin grubu (n=3):** Bu gruptaki tavşanlara deney süresince 25 mg/ml/kg olacak şekilde zeytinyağında çözülen stobadin gavaj yardımı ile oral yoldan verildi. Bu işlem 90 gün boyunca 48 saatte bir tekrarlandı.

### 3.3. DNA Fragmentasyonu (Apoptozis) Analizi:

Apoptozis; Roche firmasına ait Apoptotic DNA Ladder Kit ile analiz edildi. İzole edilen genomik DNA fragmentleri yatay ve dikey jel elektroforezlerinde incelendi.

#### Örneklerin Hazırlanması:

- 40-50 mg beyin dokusu tartılıp eppendorf tüplere alındı.
- Tartılan dokular Tris EDTA Buffer Solution (TE)'de 1/20 oranında seyreltildi.
- Doku örnekleri IKA T10 Basic ULTRA-TURRAX bıçaklı homojenizatörde homojenize edildi.
- Homojenatlar 14000xg'de, +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Oluşan pelet üzerindeki süpernatantlar atıldıktan sonra peletler genomik DNA analizi için kullanıldı.

- Bir tüpe kitten 200 µl pozitif kontrol (marker) alındı.
- Her tüpe kitten 200 µl DNA'ya bağlanma solüsyonu eklendi.
- Tüpler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra örnekler pipet yardımı ile filtreli tüplere aktarıldı.
- 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpünde biriken sıvı döküldü.
- Tüplere 500 µl yıkama solüsyonu eklendi. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüpündeki sıvı döküldü. İşlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra tüpler santrifüjden çıkartılmadan 13000 rpm'de 10 saniye daha santrifüj edildi.
- Filtreler yeni eppendorf tüplere aktarıldı.
- Her tüpe 70 °C sıcak su banyosunda ısıtılmış elüsyon solüsyonundan 200 µl ilave edildi.
- Tüpler 8000 rpm'de santrifüj edildi.
- Filtreli tüpler atıldı. Analiz için toplama tüpünde biriken örnekler kullanıldı.

#### **% 1.2 Agaroz Jelin Hazırlanması:**

- 1,8 g agarose tartıldı.
- 150 ml Tris-Acetate-EDTA (TAE) eklendi.
- Mikrodalga fırında 360 °C'de çözdürüldükten sonra 10 µl ethidium bromide eklendi. Jel solüsyonunun sıcaklığı 50-60 °C'ye geldiğinde jel tankına döküldü.

#### **Tris/Borate/EDTA (TBE) Solüsyonunun Hazırlanması:**

- 54 g Tris,
- 27.5 g Borik asit,
- 2.9 g EDTA 1 litre distile suda çözülerek 5XTBE hazırlandı. Çalışmada 1XTBE kullanılacağı için 1/5 oranında seyreltilerek kullanıldı.

**Analiz:**

- Eppendorf tüplere her örnekten 20 µl alındı.
- Her tüpe 5 µl boya (5X) eklendi.
- Her yuvasına 10 µl örnek yüklenerek yatay elektroforezde 1XTBE'de 150 V'de yaklaşık 40 dakika yzdzürülen jel KODAK Image Station 4000MM Pro cihazında görüntüledi.

**3.4. Nitrik Oksit Analizi**

Assay Designs firmasına ait Nitric Oxide (NO<sup>2-</sup>/NO<sup>3-</sup>) Assay Kit kullanıldı. Okumalar; BMG Labtect FLUOStar Omega cihazında yapıldı.

**Doku Homojenizasyonu:**

- 40-50 mg beyin dokusu tartılarak eppendorf tüplere alındı.
- Dokular Phospat Buffered Saline (PBS)'de 1/20 oranında seyreltildi.
- IKA T10 Basic ULTRA-TURRAX bıçaklı homojenizatörde homojenize edilerek 14000xg'de +4°C'de 13 dk santrifüj edildi.
- Süpernatantlar kullanılmak üzere eppendorf tüplere aktarıldı.

**Standartların hazırlanması:**

Çizelge 3.1: NO Standartlarının hazırlanması

Standart No	Reaksiyon Solüsyonu (µl)	Nitrat standart (µl)	Konsantrasyon (µM)
1	900	100	100
2	500	Standart 1'den 500	50
3	500	Standart 2'den 500	25
4	500	Standart 3'ten 500	12.5
5	500	Standart 4'ten 500	6.2
6	500	Standart 5'ten 500	3.125

**Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması:****NADH Hazırlanması:**

- 450 µl NADH ayıracı
- 900 µl dH<sub>2</sub>O

**Final Enzim Solüsyonu:**

- 460 µl Nitrat Redüktaz
- 690 µl Reaksiyon solüsyonu

**Örneklerin Hazırlanması:**

Çizelge 3.2: NO örneklerinin hazırlanması.

Örnek/Standart	NADH (µl)	Final Enzym Solution (µl)	GriesI (ayıraç) (µl)	GriesII (ayıraç) (µl)
Örnek	25	25	50	50
Standart 1	25	25	50	50
Standart 2	25	25	50	50
Standart 3	25	25	50	50
Standart 4	25	25	50	50
Standart 5	25	25	50	50
Standart 6	25	25	50	50

Kit protokolü uygulanarak standartlar ve örnekler mikropalakaya yerleştirildi. BMG FluoStar Omega cihazında 550 nm'de okundu. Örneklerden elde edilen absorbans değerleri standart kurveden oluşan formül yardımı ile hesaplandı.

### 3.5. GSH Analizi:

Örneklerin hazırlanması esnasında Assay Designs firmasına ait Toplam Glutasyon Analiz Kiti kullanıldı. Homojenizasyon için MP Fast Prep 24 cihazı kullanıldı.

#### 3.5.1. Okside Glutasyon:

##### Metafosforik asit hazırlanması (%0.5):

- 5 g metafosforik asit 100 ml distile suda çözüldü.

##### Doku Homojenizasyonu:

- 50-60 mg beyin dokusu tartılarak eppendorf tüplere alındı.
- Dokular hazırlanan metafosforik asit içerisinde 1/20 oranında seyreltildi.
- MP Fast Prep 24 cihazında 6m/s hızında 1 dakika homojenize edildi.
- Dokular 14000 x g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatantlar alınarak yeni tüplere aktarıldı.

##### Standartların hazırlanması:

Çizelge 3.3: GSH standartlarının hazırlanması.

Standart No	Çalışma Solüsyonu (µl)	GSSG (µl)	Konsantrasyon (µM)
4	50	50	100
3	50	Standart 4'ten 50	50
2	50	Standart 3'ten 50	25
1	50	Standart 2'den 50	12.5

Kit protokolü uygulanarak standartlar ve örnekler mikropalakaya yerleştirildi. BMG Fluostar Omega cihazında 410 nm'de 2'şer dakika ara ile 5 okuma yapıldı.

### 3.5.2. Toplam Glutasyon:

#### Metafosforik asit hazırlanması (%0.5):

5 g metafosforik asit 100 ml distile suda çözüldü.

#### Doku Homojenizasyonu:

- 50-60 mg beyin dokusu tartılarak eppendorf tüplere alındı.
- Dokular hazırlanan metafosforik asit içerisinde 1/20 oranında seyreltildi.
- MP Fast Prep 24 cihazında 6m/s hızında 1 dakika homojenize edildi.
- Dokular 14000 x g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatantlar alınarak yeni tüplere aktarıldı.

#### Standartların hazırlanması:

Çizelge 3.4: Toplam glutasyon standartlarının hazırlanması.

Standart No	Çalışma Solüsyonu (µl)	GSSG (µl)	Konsantrasyon (µM)
4	50	50	100
3	50	Standart 4'ten 50	50
2	50	Standart 3'ten 50	25
1	50	Standart 2'den 50	12.5

Kit protokolü uygulanarak standartlar ve örnekler mikropateye yerleştirildi. BMG Labtect FLUOStar Omega cihazında 410 nm'de 2 da'şer dakika aralıklarla ile 5 okuma yapıldı.



### 3.6. Protein Miktar Tayini

#### Doku Homojenizasyonu:

- 100-120 gr beyin dokusu tartılarak eppendorf tüplere alındı.
- Dokular Protein Extraction içerisinde 1/10 oranında seyreltildi.
- MP Fast Prep 24 cihazında 6m/s hızında 60 saniye homojenize edildi.
- Dokular 14000xg'de +4°C'de 8 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatantlar alınarak yeni tüplere aktarıldı.

#### Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması:

- Kitten 25 µl ayıraç, çalışma solüsyonu ile 5000 µl'ye tamamlandı.

#### Standartların Hazırlanması:

Çizelge 3.5: Protein miktar tayini standartlarının hazırlanması.

Standart No	Solüsyon (µl)	Protein Standartı (ng/µl)	Konsantrasyon (µM)
1	190	0	0
2	190	200	50
3	190	400	100

#### Örneklerin Hazırlanması:

Çizelge 3.6: Protein miktar tayini örneklerinin hazırlanması

Örnekler (µl)	PBS (µl)
10	990

Örnekler Invitrogen firmasına ait QBit cihazında fluorimetrik olarak okundu.

### 3.7. Protein Karbonil Analizi

Protein Karbonil analizi OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit ile hazırlandı.

#### Standartların Hazırlanması:

1. Kitten 20 µl Okside BSA Standart, PBS ile 2000 µl'ye tamamlandı.
2. Kitten 20 µl Redükte BSA Standart, PBS ile 2000 µl'ye tamamlandı.

Çizelge 3.7: Protein karbonil standartlarının hazırlanması.

Standart No	Okside BSA (µl)	Redükte BCA (µl)	Protein Karbonil (nmol/mg)
1	400	0	7.5
2	320	80	6.0
3	240	160	4.5
4	160	240	3.0
5	80	320	1.5
6	40	360	0.75
7	20	380	0.375
8	0	400	0

Kit protokolü uygulanarak standartlar ve örnekler mikropalakaya yerleştirildi. BMG Labtect FLUOStar Omega cihazında kolorimetrik okuma yapıldı.

### 3.8. Proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) İle İncelenmesi:

#### Dokuların Homojenizasyonu:

- 20-25 mg doku tartılarak eppendorf tüplere alındı.

- Protein ekstraksiyon solüsyonu içinde 1/20 oranında seyreltildi.
- MP Fast Prep 24 cihazında 6m/sn hızda 1 dakika homojenize edildi.
- Homojenize edilen dokular 10000 x g'de santrifüj edildi.
- Süpernatant peletten ayrıldı. Analiz için süpernatantlar kullanıldı.

**Analiz:**

- Tüplere örneklerden 30 µl alındı.
- Her tüpe Invitrogen firmasına ait NuPAGE LSD Sample Buffer (4X) eklendi.
  - SDS-PAGE'nin her yuvasına 10 µl örnek yüklenerek (1X) Tris EDTA solüsyonunda 85 V'de yaklaşık 75 dakika yzürülen jel Coomassie Blue ile boyandıktan sonra KODAK Image Station 4000MM Pro cihazında görüntülendi.

**3.9. Proteinlerin İmmüno Blot Analizi (Western Blot):**

İmmüno blot analizi için Western Blot tekniği kullanıldı.

**Dokuların Homojenizasyonu:**

- 20-25 mg doku tartılarak eppendorf tüplere alındı.
- Protein ekstraksiyon solüsyonu içinde 1/20 oranında seyreltildi.
- MP Fast Prep 24 cihazında 6m/sn hızda 1 dakika homojenize edildi.
- Homojenize edilen dokular 10000 x g'de santrifüj edildi.
- Süpernatant peletten ayrıldı. Analiz için süpernatantlar kullanıldı.

**Analiz:**

- Tüplere örneklerden 30 µl alındı.
- Her tüpe Invitrogen firmasına ait NuPAGE LSD Sample Buffer (4X) eklendi.

- SDS-PAGE'nin her yuvasına 18 µl örnek yüklenerek 1X Tris EDTA solüsyonunda 85 V'de yaklaşık 75 dakika yüzdürüldü.
- Protein transferi için İnvitrogen firmasına ait kuru blotlama (iBlot Dry Blotting System) cihazı ve yine aynı firmaya ait kit kullanıldı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Araştırma Bulguları

Çalışmada sırasıyla kontrol grubu 2500±150g (n=3), genç kontrol grubu 1000±100g (n=3), resveratrol grubu 2500±150g (n=5) ve stobadin grubu 2500±150g (n=3) olmak üzere dişi tavşanlar kullanıldı. Bunlar sırasıyla; 1.Grup; genç kontrol (etken madde uygulanmayan 6 aylık genç grup), 2. Grup; kontrol (etken madde uygulanmayan yaklaşık iki yaşındaki grup), 3. Grup; kontrol + resveratrol (90 gün boyunca 48 saatte bir 25mg/ml/kg resveratrol uygulanan yaşlı grup) ve 4. Grup; kontrol + stobadin (90 gün boyunca 48 saatte bir 25mg/ml/kg stobadin uygulanan yaşlı grup) olmak üzere düzenlendi.

Grupların beyin dokusunda bulunan indirgenmiş glutatyon (GSH), nitrik oksit (NO), protein miktarı, protein karbonil (PCO) BMG Labtect FLUOStar Omega cihazı yardımı ile ölçülüp kaydedildi.

Grupların beyin dokusunda apoptotic DNA Ladder kit ile apoptozise bakılıp agaroz jelde yüzdürülerek Kodak Image Station 4000MM Pro cihazı yardımı ile görüntü elde edilmiştir.

#### 4.1.1. Klinik Sonuçlar:

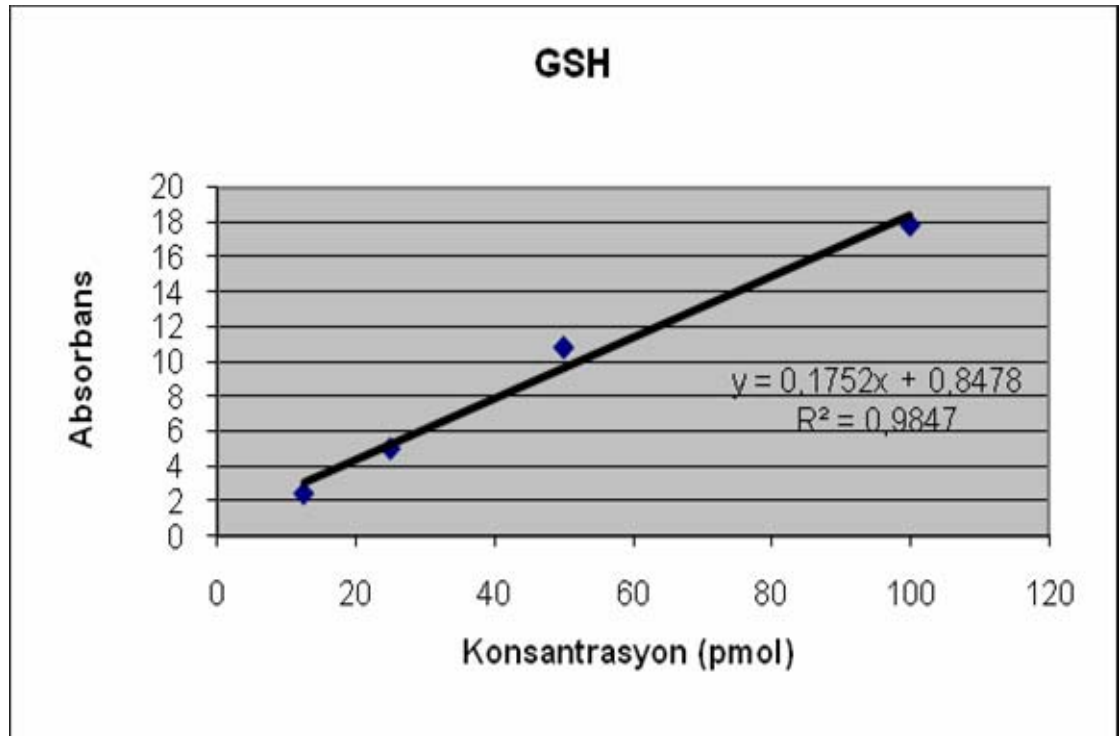
Hiçbir grupta yem ve su tüketiminde anormal durumlar gözlenmedi.

#### 4.1.2. GSH Analizi Sonuçları:

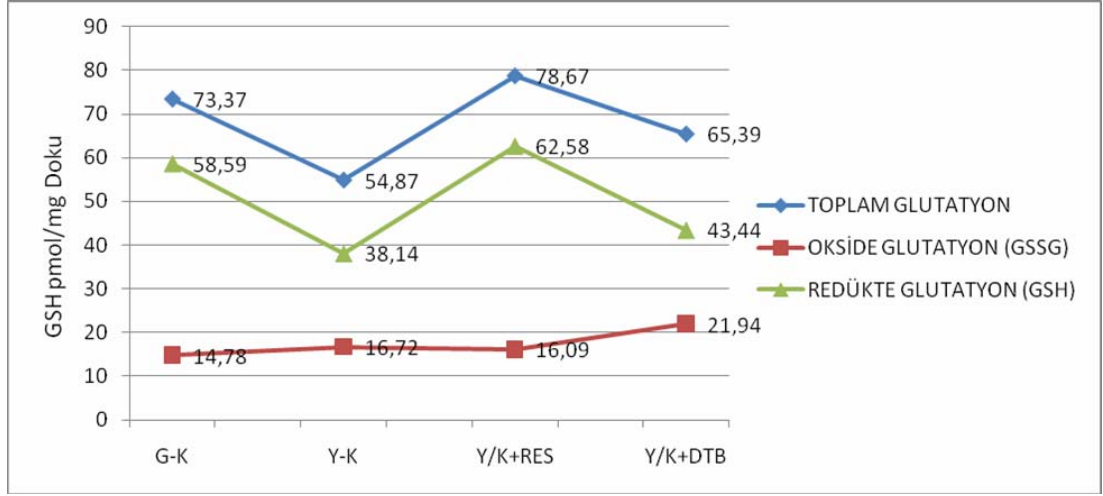
Beyin dokusu GSH seviyeleri mikropilaka okuyucuda 550 nm dalga boyunda okunarak absorban değerleri kaydedildi.

Çizelge 4.1: Beyin dokusu toplam glutatyon, GSSG ve GSH değerleri

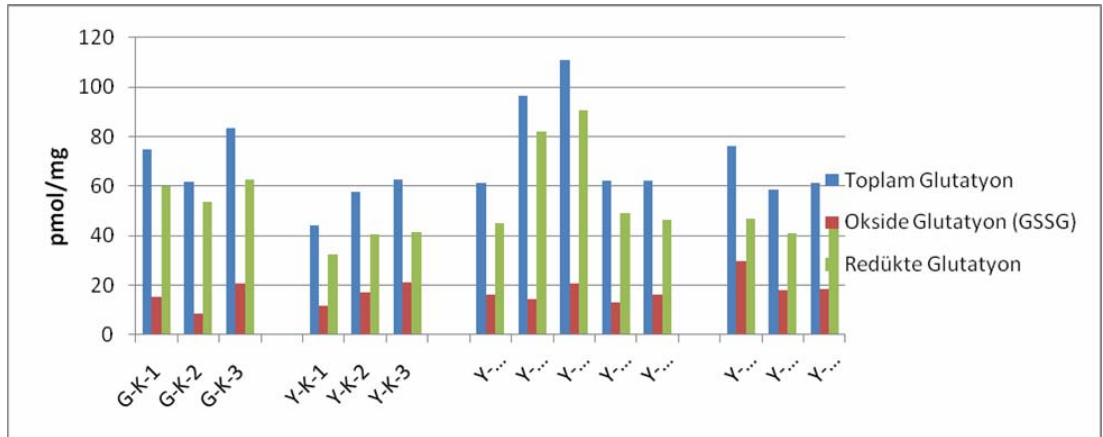
ÖRNEKLER	Toplam Glutatyon		Okside Glutatyon (GSSG)		GSH
	ABSORBANS	pM	ABSORBANS	pM	pM
G-K 1	14,31	74,78	3,55	15	59,78
G-K 2	12	61,95	2,39	8,56	53,39
G-K 3	15,86	83,39	4,59	20,78	62,61
Y-K 1	8,81	44,22	2,98	11,83	32,39
Y-K 2	11,25	57,78	3,92	17,06	40,72
Y-K 3	12,12	62,61	4,68	21,28	41,33
Y/K-Res 1	11,87	61,22	3,78	16,28	44,94
Y/K-Res 2	18,25	96,67	3,46	14,5	82,17
Y/K-Res 3	20,84	111,05	4,53	20,44	90,61
Y/K-Res 4	12,02	62,06	3,2	13,06	49
Y/K-Res 5	12,08	62,39	3,76	16,17	46,22
Y/K-STB 1	14,06	76,39	6,16	29,5	46,89
Y/K-STB 2	11,4	58,61	4,06	17,83	40,78
Y/K-STB 3	11,86	61,17	4,18	18,5	42,67



Şekil 4.1: GSH standartlarından elde edilen değerler ve kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.2: Deney gruplarının toplam glutatyon, GSSG ve GSH düzeyleri.

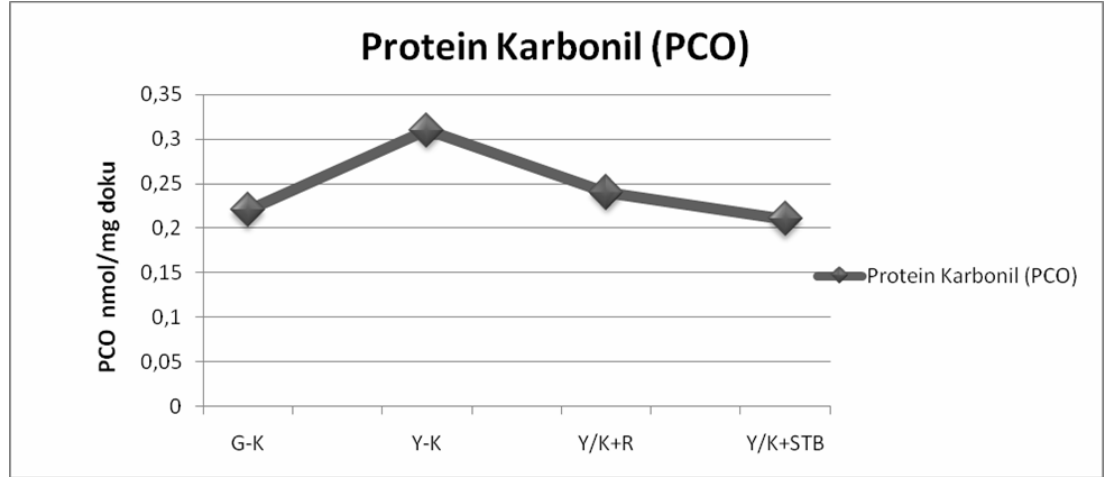


Şekil 4.3: Deney Gruplarının toplam glutatyon, GSSG ve GSH düzeyleri.

Grupların beyin GSH seviyelerindeki değişimler incelendiğinde yaşlı kontrol grubuna göre deney gruplarında görülen artış, istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

#### 4.1.3. Protein Karbonil (PCO) Analizi Sonuçları:

Beyin dokusu PCO seviyeleri mikrolpaka okuyucuda 450 nm dalga boyunda okunarak absorbands değerleri kaydedildi.



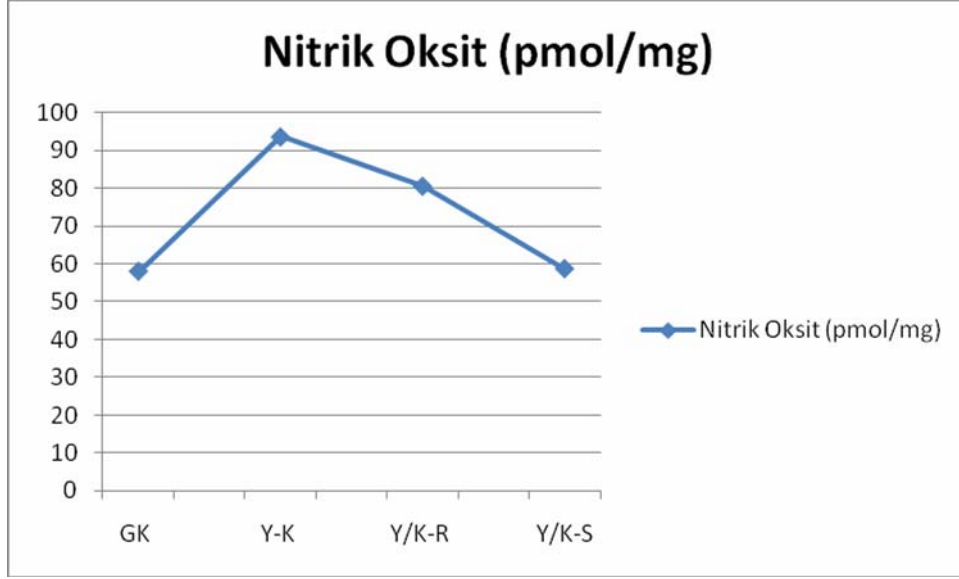
Şekil 4.4: Deney gruplarının protein karbonil (PCO) düzeyleri.

Grupların beyin PCO seviyelerindeki değişimler incelendiğinde yaşlı kontrol grubuna göre deney gruplarında görülen azalış, istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

#### 4.1.4. Nitrik Oksit Analizi Sonuçları:

Nitrik oksit (NO); nitrik oksit sentaz (NOS) adlı enzim ile arjininden endojen olarak elde edilir. Düşük konsantrasyonda, MSS'de biyolojik haberci molekül gibi davranır ve fizyolojik şartlarda sinaptik plastisite, hafıza oluşumu, vazodilatasyon ile serebral kan akımı ve nöroendokrin sekresyon gibi birçok fonksiyonda rol oynar. Nöronal olarak üretilen NO'un hafıza oluşumunda rol oynadığına dair bazı kanıtlar vardır. Ancak yüksek konsantrasyonda NO, O<sub>2</sub> ile veya süperoksit anyonu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ile reaksiyona girerek reaktif nitrojen-oksijen radikallerini (RNOS) oluşturur (Lieberman,2008).



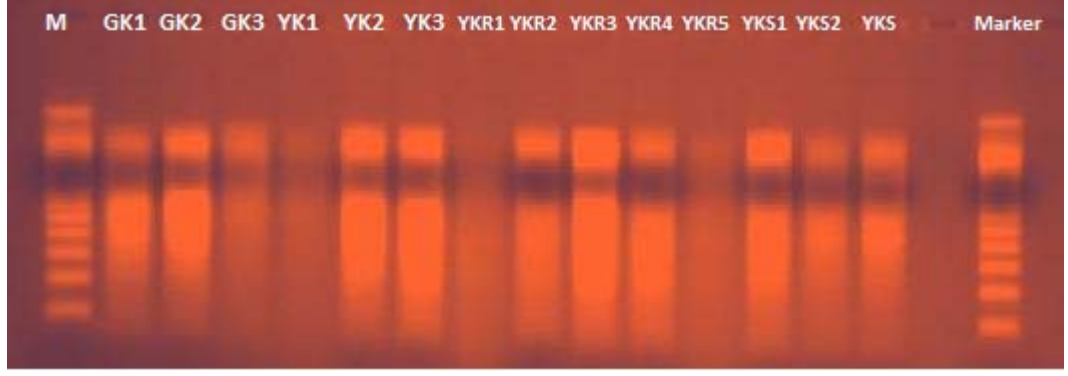


Şeki 4.5: Deney Gruplarının Nitrik Oksit Düzeyleri

Grupların beyin nitrik oksit seviyelerindeki değişimler incelendiğinde yaşlı kontrol grubuna göre deney gruplarında görülen azalış, istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

#### 4.1.5. DNA Fragmentasyonu (Apoptozis) Analizi Sonuçları:

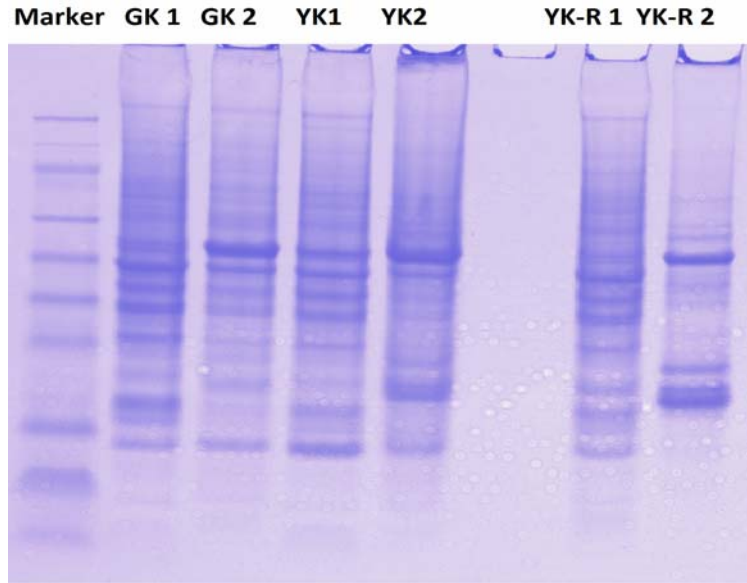
Apoptozisin en önemli özgül yönü DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Küçük molekül yapısına sahip DNA bantları ağır olanlardan daha hızlı bir şekilde hareket ettiğinden daha hızlı bir şekilde ilerler. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsünün ortaya çıkmasına neden olur.



Şekil:4.6: Beyin dokusu apoptozis görüntüleri (M: Marker, GK: Genç Kontrol, YK: Yaşlı Kontrol, YKR: Yaşlı Kontrol+Resveratrol, YKS: Yaşlı Kontrol+Stobadin)

#### 4.1.6 Proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ve İmmünoblot Analizi (Western Blot) Sonuçları:

İlk olarak Shapiro ve ark. Tarafından 1967 yılında kullanılmaya başlanan ve günümüzde yaygın bir şekilde kullanılan SDS-PAGE, bir ortamdaki protein moleküllerinin bantlarına ayrılması ve görüntülenmesi için kullanılmaktadır (Dilsiz, 2009). Bu uygulama çalışmamızda dikey jel elektrofrezinde yapılmış ve aşağıdaki görüntü elde edilmiştir.



Şekil 4.7: Beyin dokusu SDS-PAGE görüntüsü

Jel elde edildikten sonra kuru blotlama sistemi kullanılarak jeldeki proteinler polivinylidene difluoride (PVDF) membranına aktarılarak apoptozis belirteci olan kaspaz enzimi boyanmış ve aşağıdaki görüntü elde edilmiştir.



Şekil 4.8: Western blot PVDF membran görüntüsü.

## 4.2. Tartışma

Oksidatif stres sonucu oluşan beyin dokusunun yıkımı ve fonksiyon yitimi, yaşam kalitesi ve süresiyle bağlantılıdır. Yaş ilerledikçe veya organizma toksin ve/veya serbest radikal üreten reaktiflere maruz kaldıklarında, antioksidan savunma elemanları işlevlerini yapamazlar. Sonuçta yaşlanmayla ilgili hastalıklar ve yaşlanma belirtileri ortaya çıkar (Le Bourg, 2001). Serbest radikaller, ateroskleroz, diabet, kanser, katarakt ve romatoid artrit gibi yaşlanma sürecinin kronik hastalıklarının başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynarlar (Pryor, 1982; Cross 1988). Yaşlanma sürecinde oksidan ve antioksidan sistem arasındaki denge daha çok oksidan yönüne kaymaktadır. Bu nedenle serbest radikal bağlantılı hastalıklara ve erken yaşlanmaya karşı koyabilmenin sırrı, organizmaların yaşam boyunca oksidatif süreçlerin bir sonucu olarak oluşan moleküler bozunmaya karşı koyabilme yeteneklerine bağlıdır.

### 4.2.1. Beyin GSH:

Hücre içinde bir tripeptit (glutamik asit, sistein, glisin) olarak sentezlenen glutatyon, NADPH'ı kullanarak hücrelere indirgeyici güç sağlamaktadır. Hücrede

esas olarak indirgenmiş formda (GSH) bulunur. Reaktif oksijen türlerinin kimyasal veya metabolik oluşumuna yol açan hücre içi ve/veya hücre dışı koşullar oksidatif stres olarak adlandırılır. Oksidatif stres ve antioksidan kapasite arasındaki denge organ veya organ sistemlerinin oksidatif strese olan duyarlılıklarını belirler. Endojen ve eksojen stresten kaynaklanan serbest radikaller ateroskleroz, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, ilaç toksisitesi, ve viral enfeksiyon gibi belirli hastalıkların patojenitesinde belirgin bir rol oynamaktadır. GSH, antioksidan vitaminler, antioksidan enzimler oksidatif hasara karşı hücreleri korumada önemli rol oynamaktadır. GSH ve GSH öncülleri antioksidan kapasiteyi korumada tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır.

Grupların beyin GSH seviyelerindeki değişimler incelendiğinde yaşlı kontrol grubuna göre deney gruplarında artış görülmüştür.

Yaşlı insanların beyin, kalp ve karaciğer dokularında GSH düzeylerinde artış olduğu saptanmıştır. Diyafram kası ve beyinde mtDNA'daki 8-OHdG'nin yaşın fonksiyonu olarak biriktiği saptanmıştır. Mitokondriyel DNA da yaşlanma ile oluşan 8-OHdG'nin glutatyonun (GSH) oksidasyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Pollardo ve ark., 199; Mecocci ve ark., 1993; Barga, 2002). Çalışmamız yapılan bu çalışmaları destekler niteliktedir. Yaşlı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deney gruplarının beyin GSH seviyelerinde görülen artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

#### **4.2.2. Beyin Nitrik Oksit (NO):**

Çalışmamızda beyin nitrik oksit düzeyleri incelendiğinde, nitrik oksitin kontrol grubunda deney gruplarına göre daha yüksek seviyede olması istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

#### 4.2.3. Beyin Protein Karbonil (PCO):

Reaktif oksijen türlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit kalıntısında ve/veya peptid omurgasında meydana gelen oksidatif hasar sonucunda PCO ürünleri meydana gelir. PCO düzeylerinin saptanmasının oksidatif protein hasarını belirlemede duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmektedir (Reznick, 1994; Takenaka, 1991). Diğer taraftan serbest radikaller proteinlerdeki tiol gruplarının oksidasyonuna yol açarak oksidatif protein hasarına neden olur (Hu, 1994; Bourdon, 1999).

Çakatay ve ark. (2000), yaşlı, genç erişkin ve erişkin grupları üzerinde plazma proteinleriyle yaptığı bir çalışmada; yaşlı grubun plazma PCO düzeylerinin Genç erişkin ve erişkinlere göre anlamlı derecede düşük bulduklarını bildirmekte ve bu durumu yaşlanmayla plazma proteinlerinde ortaya çıkan oksidatif protein hasarıyla ilişkili olduğunu ileri sürmektedirler.

Garcia-Arumi ve arkadaşlarının (1998) lenfositlerle yaptığı bir çalışmada ise yaşlı bireylerin antioksidan savunma sistemlerinde zamanla bir azalma görülmediğini, ancak buna karşılık PCO düzeylerindeki artışa bağlı olarak oksidatif protein hasarında artış görüldüğü bildirilmiştir.

Çalışmamız bu çalışmalarını destekler niteliktedir. Çalışmamızın sonucuna göre yaşlı tavşan beyin PCO seviyeleri deney gruplarına göre daha yüksektir. Kontrol grubundaki bu artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuş ve yaşlanmayla beyin proteinlerinde ortaya çıkan oksidatif protein hasarıyla ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

#### 4.2.4. Beyin Apoptozis:

Apoptozis organizmada hastalıkların yanı sıra fizyolojik süreçte de yer alır (Dilsiz, 2009). Yaptığımız analiz sonucu da bunu doğrulamaktadır. Henüz çok ileri seviyede yaşlanma gerçekleşmediği için apoptozisin son aşamaları görülmemektedir.

#### 4.2.5. İmmünoblot Analizi (Western Blot):

Yapılan çalışma sonucunda elde protein jel görüntülerinde ve western blot çalışması sonucu apoptozise neden olan caspaz enzim aktivitesinin varlığı gruplar arasında farklılık göstermemektedir. Bunun nedeninin ise yaşlanma olgusunun henüz çok ileri seviyede olmamasından ve apoptozisin fizyolojik süreç içerisinde tüm gruplarda devam ediyor olabileceği düşüncesini doğrulamaktadır.

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Yaşlanmanın temel prensipleri ve özelliklerini açıklamaya çalışan biyolojik mekanizmalar genellikle teori seviyesindedir ve hiç biri yaşlanmayı açıklamak için tek başına yeterli değildir.

Yaşlanmayla ilgili öne sürülen teorilerden biri de serbest radikal teorisi. Araştırmacılar, canlının yaşamı boyunca etkilendiği ROS'un oksidatif hasara neden olabileceğini ileri sürmektedir. Kümülatif ve potansiyel olarak artan miktardaki hasar, yaşlanmadaki fonksiyonel ve patolojik bozukluklara yol açar.

Serbest radikallerin DNA, lipid, karbohidrat ve proteinlerde hasara yol açtığı, fakat oksidatif strese bağlı olarak oluşan *in vivo* DNA ve protein hasarının lipid hasarından daha önemli olduğu bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmektedir. Aralarında resveratrol ve stobadinin de bulunduğu antioksidanlar, serbest radikalleri etkisizleştirerek ya da ortamdaki uzaklaştırarak, bu zararlı etkilerine karşı gelmektedir.

Bitkilerden elde edilen antioksidanlar son yıllarda yoğun bilimsel araştırmalara konu olan ve buna paralel olarak da giderek artan bir kullanım potansiyeline sahip doğal bileşiklerin başında gelmektedir. Resveratrol özellikle üzüm bitkisinde çeşitli dış etkenlere (UV, enfeksiyon, zedelenme) karşı sentezlenen bir fitoaleksindir. Stobadin ise resveratrolün aksine heterosiklik indol türevlerinden prodoindol yapısında yapay bir antioksidandır.

Çalışmamızda resveratrol ve stobadin maddelerinin yaşlı tavşan beyin hasarına etkisi incelendi. Yaşlı tavşanlara gavaj yardımı ile 25 mg/ml/kg olarak verilen resveratrol ve stobadin maddeleri ile onların antioksidan savunma sistemleri güçlendirilmeye çalışıldı. Deney bitiminde deney gruplarının beyin dokularında redükte glutatyon (GSH), nitrik oksit (NO<sup>•</sup>), protein karbonil düzeyleri incelendi. Aynı zamanda yine beyin dokusunda apoptozis ve immünoiblot analizi yapıldı.

Yapılan analizler sonunda yaşlı kontrol grubunda GSH düzeylerinin genç kontrol, yaşlı kontrol+resveratrol, yaşlı kontrol+stobadin gruplarına göre düşük olması istatistiki olarak anlamlı bulundu. Yaşlı kontrol+resveratrol grubunda GSH düzeyinin genç kontrol grubuna göre yüksek olması, resveratrolün GSH sentez mekanizmasında hızlandırıcı rol oynayabileceği düşüncesini doğurmaktadır.

Grupların PCO seviyelerindeki değişimler incelendiğinde yaşlı kontrol grubunda PCO düzeylerinin genç kontrol, yaşlı kontrol+resveratrol, yaşlı kontrol+stobadin gruplarına göre yüksek olması istatistiki olarak anlamlı bulundu. Protein oksidasyonunun protein karbonil (PCO) gibi markerlarının yaşlı kontrol grubunda *in vivo* protein oksidasyonunun derecesini göstermektedir. Çalışmamızın sonuçları Garcia-Arumi (1998) ile Çakatay ve arkadaşlarının (2000) yaptığı çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Grupların nitrik oksit seviyelerindeki değişimler incelendiğinde yaşlı kontrol grubunda nitrik oksit seviyelerinin genç kontrol, yaşlı kontrol+resveratrol, yaşlı kontrol+stobadin gruplarına göre yüksek olması istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Nitrik oksit düzeyinin belirli bir orana kadar sinyal görevi yaptığı bulgusu çalışmamızın sonuçları ile de desteklenmektedir.

Apoptozis organizmada hastalıkların yanı sıra fizyolojik süreçte de yer alır (Dilsiz, 2009). Yaptığımız analiz sonucu da bunu doğrulamaktadır. Henüz çok ileri seviyede yaşlanma gerçekleşmediği için apoptozisin son aşamaları görülmemektedir.



Yapılan çalışma sonucunda elde protein jel görüntülerinde ve western blot çalışması sonucu apoptozise neden olan caspaz enzim aktivitesinin varlığı gruplar arasında farklılık göstermemektedir. Bunun nedeninin ise yaşlanma olgusunun henüz çok ileri seviyede olmaması ve apoptozisin fizyolojik süreç içerisinde tüm gruplarda devam ediyor olabileceği düşüncesini doğurmaktadır.

## **5.2. Öneriler**

Bu çalışmada siyah üzümde elde edilen resveratrol maddesi ile kimyasal yolla elde edilen stobadin moleküllerinin yaşlanma mekanizması üzerindeki rollerini araştırdık.

Resveratrol ve stobadinin tavşan beyin dokusu örneklerinde yaşlılığın göstergesi olan oksidatif stresi belli oranda yavaşlattığını, protein ve DNA oksidasyon ürünlerinin incelenmesi sonucu elde edilen sonuçlardan anlamaktayız.

Sonuç olarak; doğal olarak sentezlenen resveratrol bakımından zengin olan siyah üzümün bu konuda önem arz ettiği görülmektedir.

İleride bu maddelerin daha farklı dozlarda, beyin dokusunun farklı bölgelerinde ve daha uzun süreli deneysel çalışmalarda analize tabi tutulacaktır.

Ülkemizin bağlık alanlarının fazla ve zengin olması nedeni ile üzüm çeşitlerine yönelik resveratrol miktarları incelenebilir. Resveratrolü bol olan üzümde veya diğer ürünlerden ticari olarak ilaç yapılabilir. Ayrıca pekmez üretimi sırasında atık olarak ayrılan resveratrol miktarı yönünden zengin olan üzüm kabukları bu yönde değerlendirilebilir.



## KAYNAKLAR

- ABDOLLAHI, M., BAHREINI-MOGHADAM, A., EMMAMI, B., FOOLADIAN, F., ZAFARIET, K., 2003. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 135: 331-336.
- ABDOLLAHI, M., RANJBAR, A., SHADNIA, S., NIKFAR, S., REZAIE, A., 2004. Pesticides and oxidative stress : a review. *Med. Sci. Monit.*, 10: 141-147.
- AFAG, F., and MUKHTAR, H., 2001. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. *J Photochem Photobiol B*. 63, 61-9.
- AKKUŞ, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. *Mimosa Yayınları*, 38(5) : 1-12.
- ALAM, ZI., DANIEL, SE., LEES, AJ., MARSDEN, DC., JENNER, P., HALLIWELL, BA., 1997. generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J Neurochem*. 69: 1326-1329.
- ALKAN, R., 2007. Doğal bitki antibiyotiği: resveratrol. *Gıda Teknolojisi Derneği*, 32(5): 259-265.
- AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M., 1993. Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Diseases of Aging. *Proc Natl Acad Sci*, 90:7915-7922.
- ANDO, Y., BRANNTSROM, T., UCHIDA, K., NYHLIN, N., NASMAN, B., SUHR, O., YAMASHITA, T., OLSSON, T., EL SALHY, M., UCINO, M., ANDO, M., 1998. Histochemical detection of 4-hydroxynonenal protein in Alzheimer amyloid. *J Neurol Sci*. 156: 172-176.
- ARMANDOLA, E., 2005. Time and the Biology of Aging. *Medscape General Medicine* 2005;7(1):1-4.
- ARICHI H., KIMURA, Y., OKUDA, H., BABA, K., KOZAWA M, ARICHI, S., 1982. Effects of stilbene components of the roots of *polygonum cuspidatum Sieb et Zuc*. On lipid metabolism. *Chem. Pharm. Bull*, 30:1766-1770.
- ARRISON, W.M., JAYKO, M.E., BENNET, T.W., 1962. Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution. *Rad Research*; 16: 483-502.
- AYAN, N., 2007. Streptozotosin ile diyabet oluşturulan rat karaciğer dokusunda oksidatif stress, paraoksonaz-1 aktivitesi ve stobadin'in koruyucu etkisinin araştırılması. Gazi Üniv. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara. Uzmanlık tezi.
- AYBEY, B., TUFAN, H., ve ERGENEKON, G., 1996. Serbest Radikaller. *Türkderm*, 30: 116-122.
- BARJA, G., 2002. Endogenous oxidative stress: Relationship to aging, longevity and caloric restriction. *Ageing Res Rev*; 1: 397-411.
- BEAL, MF., 2002. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med*. 32: 797-803.
- BEUTLER, E., DURON, O., KELLY, BM. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. May;61:882-8.

- BEZAKOVA, Z., BLESOVA, M., BACHRATA, M., 1993. Stobadine Hydrochloride: study of physical and chemical properties and stability of agent. *Farm. Obzor.* 62, 247-252.
- BRUCKDORFER, K.R., 1987. Lipids and Cancer. *Procx. Roy. Soc. Med.* 80: 713-714.
- BUTTERFIELD, DA., LAUDERBACK, CM., 2002. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid  $\beta$ -peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 32: 1050-1060.
- BUTTERFIELD, DA., DRAKE, J., POCERNICH., C, CASTEGNA, A., 2001. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med.* 7: 548-554.
- CALINGASAN, NY., UCHIDA, K., GIBSON, GE., 1999. Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 72: 751-756.
- CONRAD, CC., MARSHALL, PL., TALENT, JM., MALAKOWSKY, CA., CHOI, C., GRACY, RW., 2000. Oxidized proteins in Alzheimer's plasma. *Biochem Biophys Res Commun;* 275: 678-681.
- CALINGASAN, NY., UCHIDA, K., GIBSON, GE., 1999. Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 72: 751-756.
- CALLEMIEN, D., COUNET, C., CAWET, Q., COLLIN, S., 2003. Hop as a determinant nutrition key for health. In proceedings of the 29th European brewery convention congress pp.1375-1382. Germany:Fachverlag Hans Karl.
- CANTOS, E., GARCIA, VC., PASCUAL, TS., TOMAS, B., 2000. Effects of postharvest UV radiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes . *J.Agric.Food.Chem,* 48: 4606-4612.
- CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A. 1997. Glikozaminoglikanlar. A. TOKULLUGİL, M. DİRİCAN, E. ULUKAYA. Lippincott's Illustrated reviews serisinde: *Biyokimya. İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul,* s. 147-156.
- CHEN, C.C., HSU, J.D., WANG, S.F., CHIANG, H.C., YANG, M.Y., KAO, E.S., HO, Y.C. AND WANG, C.J. 2003. Hibiscus sabdariffa extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *J. Agri. Food Chem.,* 51: 5472-5477.
- CHEN, RS., WU, PL., ROBBIN, YY., 2002. Peanut roots as a source of resveratrol . *J.Agric.Food.Chem,* 50: 1665-1667.
- CHEN, SS., CHANG, LS., WEI, YH., 2001. Oxidative damage to proteins and decrease of antioxidant capacity in patients with varicocele. *Free Radic Biol Med.* 30: 1328-1334
- CHRISTINE, C., CALLEMINEN, D., COLLIN, S., 2006. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chemistry,* 98: 649-657.

- COMPORTI, M. 1985. Biology of disease: lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. Lab. Invest.; 53: 599-623.
- CROSS CE, HALLIWELL B, BORISH ET, PRYOR WA, AMES BN, SAUL RL, ET AL.,1987 Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med ;107:526-45.
- CROSS, C.E., HALLIWELL, B., BORISH, E.T., 1987. Ann Intern Med. 107: 526-545.
- CUMMINGS, M.C., WINTERFORD, C.M., WALKER, N.I., 1997. Apoptosis. Am J Surg Pathol, 21(1):88-101.
- ÇAKATAY, U., TELCİ, A., 2000 Oksidatif protein hasarı ve saptanmasında kullanılan marker'lar. Tıp Fak Dergisi. 63: 314-317.
- DALLE-DONNE, I., GIUSTARINI, D., COLOMBO, R., ROSSI, R., MILZANI, A., 2003 Protein carbonylation in human diseases.Trends in Mol Med. 9: 169-176.
- DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., GIUSTARINI, D., MILZANI, A., COLOMBO, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta. 329: 23-38.
- DAVIES, MJ., FU S, WANG, H., DEAN, RT.,1999. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. Free Radic Biol Med. 27: 1151-1163.
- DİKİCİ, İ. 1999. Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması. Selçuk Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 73s (yayınlanmamış).
- DİLSİZ, N., 2009. Moleküler Biyoloji. Palme yayıncılık.146-151.
- DOBRYDNEVA, Y., WILLIAMS, RL., BLACKMORE, PF., 1999. Trans-resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. Br. J. Pharmacol, 128:149-157.
- DOCHERTY, JJ., FU, MM., TSAI, M., 2001. Resveratrol selectively inhibits Neisseria meningitidis and Neisseria gonorrhoeae. J.Antimicrob Chemother , 47:243-244.
- DOCHERTY, JJ., FU, MMH., STIFFLER, BS., LIMPEROS, RJ., POKABLA, CM., DELUCIA, AL., 1999. Resveratrol inhibition of *Herpes simplex* virus replication. Antiviral Res, 43:135-45.
- DOUILLET, B., JEANDET, P., ADRIAN, M., BESSIS, R.. 1999. Changes in the pytoalexin content of various vitis spp in response to ultraviolet C elicitation. J.Agric.Food.Chem ,47: 4456-4461.
- DÜNDAR, Y., ASLAN, R., 2000. Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, 29 : 95-101.
- ERDOĞAN, B.B., 2003. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. Akciğer Arşivi, 4: 165-174.
- EVANS, P., LYRAS, L., HALLIWELL, B., 1999. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. Methods Enzymol. 300: 145-156.

- FILIP, V., PLOCKOVA, M., MIDRKAL, J., PIKOVA, Z., MELZOCH, K., SCHMIDT, 2003. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chemistry*, 83:585-593.
- FIRAT, S. 1997. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon , glutatyon peroksidaz, glutatyon- S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi. Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B.Dalı, Uzm.Tezi, Ankara, 95s (yayınlanmamış).
- FERBEYRE, G., LOWE, SW., 2002. The price of tumour suppression? *Nature*. 415:26-7.
- FLEMING, JE., MIGUEL, J., COTTRELL, SF., YENGOYAN, LS., 1982. Economos AC. Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome? *Gerontology*. 28:44-53.
- GARCIA-ARUMI, E., ANDREU, AL., LOPEZ-HELLIN, J, SCHWARTZ, S., 1998. Effect of oxidative stress on lymphocytes from elderly subjects. *Clin Sci*. 94: 447-452.
- GRASL-KRAUPP, B., BURSCH, W., RUTTKAY-NEDECKY, B., WAGNER, A., LAUNER, B., SCHULTE-HERMANN, R., 1994. Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:9995-9.
- GEORGIEVA , N.V., 2005. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – A Review. *Bulgarian J. Vet. Med.*; 8: 1:11.
- GRACY, RW., YUKSEL, KU., CHAPMAN, MD., et al. 1985. Impaired protein degradation may account for the accumulation of “abnormal” proteins in aging cells. In: Adelman RC, Dekker EE, editors. *Modern aging research, modification of proteins during aging*. New York: Alan R. Liss. p.1-18.
- GUTTERIDGE, J.M.C., 1995. Lipid Peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.*; 41/12: 1819-1828.
- HALLIWELL, B., 1984. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*. 23:1396-1397
- HALLIWELL, B., 1991. Reactive Oxygen Species in Living System: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *The Am. J. Med*. 91: 145-215.
- HALLIWELL, B., 1996. Oksidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant in take in humans. *eFree Radical Res*. 25: 57-74.
- HALLIWELL, B., and GUTTERIDGE, J.M.C., 1989: *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford, Clarendon Pres; pp.177-178.
- HALLIWELL, B., CHİRİCO, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*; 57: 715-25.
- HAMMADDELER, 2009. Eriřim Adresi: [http:// www.hammaddeler.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=3095&Itemid=297](http://www.hammaddeler.com/index.php?option=com_content&view=article&id=3095&Itemid=297)  
Eriřim Tarihi: 16.05.2009.
- HARMAN, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 11:298-300.
- HAYFLICK, L., MOORHEAD, PS., 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 37:614-36.

- HEMANN, MT., STRONG, MA., HAO, LY., GREIDER, CW., 2001. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*. 107:67-77.
- HIKIM, A. P. S., WANG, C., LEUNG, A.R., SWERDLOFF, S., 1995. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*, 136 (6): 2770-2775.
- HURST, R., BAO, Y., JEMTH, P., MANNERVI, B., WILLIAMSON, G., 1997. Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Activity of Rat Class Theta Glutathione Transferase T2-2. *Biochem. Soc. Trans.*, 25, S559
- INAGI, R., MIYARA, T., 1999. Oxidative protein damage with carbohydrates and lipids in uremia: "carbonyl Stress". *Blood Purif*, 17:95-98.
- JORNOT, L., PETERSEN, H., JUNOD, A.F., 1998. *Biochem J*, 335: 85-94.
- JAZWINSKY, SM., 1996. Longevity, genes, and aging. *Science*. 6;273:54-9.
- KARASU, Ç., STEFEK, M., 2009 Pridindollerin Son On Yılına güncel bir Bakış. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* ;29(Suppl):S25-S28
- KERR, J.F.R., WINTERFORD, C.M., HARMON, B.V., 1994. Apoptosis; its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73 (8): 2013-2026.
- KÖSE, K., ve DOĞAN, P., 1992. Lipid Peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi*, 1: 340-350.
- LANGCAKE, P., PRYCE EJ., 1977. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*, 33: 151-152.
- Le BOURG, E., 2001. Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*: 498:183-6. Review.
- LEVINE, RL., STADMAN, ER., 1996. Protein modifications with aging. In: Schneider EL, Rowe JW, editors. *Handbook of the biology of aging*. San Diego (CA): Academic Press. p.184-97.
- LIEBERMAN, MA., MARKS, A., 2008. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins; 3rd edition; 439-57.
- LINNANE, AW., ZHANG, C., BAUMER, A., NAGLEY, P., 1992. Mitochondrial DNA mutation and the ageing process: bioenergy and pharmacological intervention. *Mutat Res*. 275:195-208.
- LONG, C.A., BİSLİSKL, H.J., 1980. Rate of Reaction of Superoxide Radical with Chloride-Containing Species. *J. Phys. Chem.*; 84: 555-557.
- MAHADY, GB., PENDLAND, SL., 2000. Resveratrol inhibits the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *Am.J.Gastroenterol*,95:1849.
- MAITA, IG., SONİA, RP., ROSA, M., LAMUELA, R., 2000. Resveratrol and piceid levels in natural and blended peanut butters. *J.Agric.Food.Chem*, 48: 6352-6354.
- MAJNO, G., JORIS, I., 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*, 146(1):3-15.
- MARION MAN, YC., 2002. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogen of the skin. *Biochemical Pharmacology*, 63:99-104.
- MARNETT, L.J., 1999. Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.*; 424: 83–95.
- MECOCCI, P., MCGARVEY, U., KAUFMAN, AE., KOONTZ, D., SHOFFNER, JM., WALLACE, DC., BEAL, MF., 1993. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol*; 34: 609-616

- MILLS ,E.M., TAKEDA, K., YU, Z.X., 1998. Biol Chem, 273: 22165-8.
- MİYATA, T., VAN-YPERSELE, D.E., STRİHOU, C., KUROKAWA, K., et al., 1999. Altrations in non-enzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of “carbonyl stress” in longterm uremic complications. *Kidney Int*, 55,388-399.
- MOBBS, CV., 1996. Neuroendocrinology of aging. In: Schneider EL, Rowe JW, editors. *Handbook of the biology of aging*. San Diego (CA): Academic Press. p. 234-82.
- MURIKAMI, S., JOHNSON, TE., 1996. A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*.143:1207-18.
- MÜFTÜOĞLU, O., 2003. Yaşasın Hayat. Doğan Kitapçılık, İstanbul.
- NALBANT, S., 2006. Yaşlanmanın biyolojisi. *Türk Fiz. Tıp Rehab. Derg.* 52(Özel Ek A): A12-A17.
- ORGEL, LE., 1963. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 49:517-21.
- PALLARDA, FV., ASENSI. M., GARCIADE LA ASUNCIÓN, J., ANTON, V., LLORET, A., SASTRE J, VINA J. 1999. Late onset administration of oral antioxidants prevents age-related loss of motor coordination and brain mitochondrial DNA damage. *Free Radic Res*: 29: 617-623.
- PRYOR, WA., 1987. Free radical biology: xenobiotics, cancer, and aging. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 393: 1-22.8.
- CROSS, CE., HALLIWEL, B., BORSH, ET., PRYOR, WA., AMES, BN., SAUL, RL., McCORD, JM., HARMAN, D., 1987. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*; 107: 526-45.
- PROKOP, J., ABRMAN, P., SELIGSON, AL., SOVAK, M., 2006. Resveratrol and Its glycon piceid are stable polyphenols. *Journal of Medicinal Food*, 9 (1) 11-14.
- SALIM, A.S., 1993. The permissive role of oxigen-derived free radicals in the development of colonic cancer in the rat. A new theory for carcinogenesis. *Int. J. Cancer*. 53: 1031-1035.
- SCHUESSLER, H., SCHİLLİNG, K., 1984. Oxygen effect in radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin. *Int J Radiat Biol.*; 45: 267-281.
- SHACTER, E., 2000. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol*; 319: 428-436.
- SHACTER, E., 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev*; 32: 307-326.
- SOBOLEV, VS., COLE, RJ., DORNER, JW., YAGEN, B., 1995. Isolation, purification and liquid chromatographic determination of stilbene phytoalexins in peanuts. *J. Assoc.off.Anal.Chem, Int* ,78:1177-1182.
- SOLEAS, GJ., DIAMONDİS, EP., GOLDBERG, DM., 1997. Resveratrol a molecule whose time has come? And gone?. *Clinical Biochemistry*, 30: 91-113.
- SOLEAS, GJ., ANGELİNİ, M., GRASS, L., DİAMANDİS EP., GOLDBERG, DM., 2001. Absorption of trans resveratrol in rats. *Methods Enzymology*, 335: 145-154.



- STADTMAN , E.R., LEVINE, R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*,; 25: 207-218.
- STADTMAN, E.R., 1988. Protein modification in aging. *J Gerontol*; 43: 112-120.
- STASKO, A., ONDIRAS, K., MISIK, V., SZÖCHOVA, H., GERGEL, D., 1990. Stobadine: a novel scavenger of free radicals. *Chem. Pap.* 44.493-500.
- STEENKEN, S., SUNDQUIST, AR., JOVANOVIĆ, SV., CROCKETT, R., SIES, H., 1992. Antioxidant activity of the pyridoindole stobadine: pulse radiolytic characterization of one-electron oxidized stobadine and quenching of singlet molecular oxygen. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 355-360.
- STOLC, S., BAUNER, V., BENES, L., TIHY , 1983. Medicine with antiarrhythmic antihypoxic activity and its method of preparation. Patent: CS229067, SWED.8204693-9, BELG.894148, SW\_SS 671 754, BRD p 3231088, SPAm 553017, JAP.151 4040.
- TAKOAKO, M., 1990. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. Fil.) *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. Ser.* 111(3) 1-16.
- TAMER, L., POLAT, G., ESKANDARI, G., ERCAN, B., ve ATIK, U., 2000. Serbest radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fak. Dergisi*, 1: 52-58.
- TOKUŞOĞLU, T., Mustafa, KÜ., Fadim, Y., 2005. Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilbene) in Peanuts and Pistachios by High performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and Gas Chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J.Agric.Food.Chem*, 53: 5003-5009.
- TROEN, BR., 2003. The biology of aging. *Mt Sinai J Med.*70:3-22.
- UYSAL, M., 1998. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengelyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*, 11: 336-341.
- VICTOR, SS., RICHARD, JC., 1999. Trans-resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *J. Agric. Food. Chem*, 47: 1435-1439.
- VARANDA, EA., TAVARES, DC., 1998. Radioprotection: mechanisms and radioprotective agents including honeybee venom. *J. Venom.Anim. Toxins*. 4:5-21.
- WALLACE, DC., 1992. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science*. 256:628-32.
- WALBURG, HE., 1975. Radiation-induced life-shortening and premature aging. *Adv Radiat Biol.* 5:145-79.
- WALFORD, RL., 1974. Immunologic theory of aging: current status. *Fed Proc.* 33:2020-7.
- WU, JM., WANG, ZR., HSIEH, TCH., BRUDER, JL., ZOU, JG., HUANG, YZ., 2001. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine. *Inter J Mol Med* , 8:3-17.
- WYLLIE, A.H., ARENDS, M.J., MORRIS, R.G., WALKER, S.W., EVAN, G., 1992. The apoptosis endonuclease and its regulation. *Semin Immunol*, 4(6):389-97.
- YAMAGUCHI, M., VE HONDA, T., 1994. *Kokai Tokkyo Koho JP.*, 18(101):99-102 (Jpn)., Ref.C.A. 107, 12958j.

- YAN, W., FLORENTINA, C., YANAN, Y., ROBIN, R., RICHARD, B., VON, B., 2002. An LC-MS Method for analyzing total resveratrol in total grape juice, cranberry juice and in wine. *J. Agric. Food. Chem.*, 50:431-435.
- ZANIAL, TA., OBERLEY, TD., ALLISON, DB., SZEWADA, LI., WIENDRUCH, R., 2000. Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle. *FASEB J.* 14:1825-36.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1980 yılında Konya'nın Yunak ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi aynı ilçede, lise eğitimimi ise Konya'nın Akşehir ilçesinde tamamladım. 1998 yılında okumaya hak kazandığım Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2002 yılında tamamladım. 2008 yılında Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalında Prof. Dr. Nihat DİLSİZ danışmanlığında başlayan yüksek lisans öğrenimimi, 2008-2011 yılları arasında yapmış olduğum tez çalışmasının sona ermesi ile tamamlamış bulunmaktayım.

## ÖZET

Organizma hayatsal faaliyetleri sırasında serbest radikaller olarak adlandırılan oldukça reaktif atom veya moleküller üretir. Serbest radikallerin yapısında çoğunlukla oksijen yer almaktadır. Hücrelerimiz aerobik solunumla enerji üretirken oksijene gerek duyduğu için serbest radikal oluşumu kaçınılmaz bir sonuçtur. Bu duruma organizma antioksidan olarak adlandırılan moleküllerle cevap verir.

Organizmada serbest radikal oluşum hızı ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Normalde organizma, oluşan serbest radikallerin üstesinden gelebilir ancak antioksidanlar her zaman yeterli miktarda alınamamakta ya da etkin kullanılabilecek durumda olmamaktadır. Veya serbest radikal oluşumu antioksidan savunma gücünü aşmaktadır. Bu durumda oksidatif denge serbest radikaller lehine bozulur ve hücrede bulunan protein, lipit, nükleik asitler ve karbonhidratlar zarar görür. Bu makromoleküllerin hasar görmesi hücrede, dolayısıyla organizmada bazı hastalıklara ya da aksaklıklara yol açar. Yaşlanma da bunlardan biridir.

Yaşlanma, tüm organizmalarda durmadan devam eden biyolojik bir süreçtir. Biyolojik yaşlanmanın tanımı konusunda henüz bir fikir birliği yoktur. Ancak genellikle olgunluk sonrası olarak anlaşılan biyolojik yaşlanma, azalmış homeostasis ve artmış hassasiyet anlamına gelir ve olgunlaşmadan ölüme kadar devam eden tüm sürede hücresel düzeydeki büyüme kapasitesi ile ifade edilir.

Yaşlanmanın mekanizmasını açıklamaya çalışan birçok teori vardır ve bunların hiç biri tek başına yeterli değildir.

Çalışmamızda yaşlanma ile ilgili teorilerden serbest radikal teorisi üzerinde durduk ve serbest radikallerin yaşlı tavşan beyninde proteinlerde meydana getirdiği değişiklikleri ve bir fitoaleksinin olan resveratrol antioksidanının ve heterosiklik indol türevlerinden, yapay bir antioksidan olan stobadinin etlilerini inceledik.

Çalışmamızda Harran Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında yetiştirilen ve ortalama ağırlıkları 2.5 kg olan *Oryctolagus cuniculus* (Yeni Zelanda Tavşanı) türü dişi tavşanlar kullanıldı. Çalışma öncesinde 15 gün boyunca deney hayvanlarının yeni kafeslerine adapte olmaları sağlandı. Bu süreçte ve çalışma esnasında tavşanlar taze marulla beslendi ve günlük su tüketimi dikkate alınarak günlük 1000 ml su verildi. Havalandırma tertibatı bulunan, sıcaklığı 24°C’de sabit tutulmaya çalışılan ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü sağlanacak şekilde deney ortamı oluşturuldu.

Adaptasyon aşaması biten tavşanlar gruplara ayrıldı: 1. Grup; genç kontrol grubu (n=3): Bu gruptaki tavşanlara herhangi bir uygulama yapılmadı. Gruplar arasında oluşabilecek farklılıkları kaldırmak amacıyla bu gruba diğer gruplarla eşit miktarda yem ve su verildi. 2. Grup; kontrol grubu (n=3): 3 dişi tavşandan oluşan bu grup, deney süresince diğer gruplarla aynı ortamda tutuldu. Gruplar arasında oluşabilecek farklılıkları kaldırmak amacıyla bu gruba diğer gruplarla eşit miktarda yem ve su verildi. 3. Grup; kontrol + resveratrol grubu (n=5): Bu gruptaki tavşanlara deney süresince 25mg/ml/kg resveratrol gavaj yardımı ile oral yoldan verildi. Resveratrol DMSO’da çözüldü. Bu işlem 48 saatte bir tekrarlandı. 4. Grup; kontrol + stobadin grubu (n=3): bu gruptaki tavşanlara deney süresince 25mg/ml/kg stobadin gavaj yardımı ile oral yoldan verildi. Stobadin zeytinyağında çözüldü. Bu işlem 48 saatte bir tekrarlandı.

Deney bitiminde hayvanlar CO<sub>2</sub> ile anestezi edilerek diseksiyona alındı. Kafatası açılarak beyin dokusu alındı. Beyin dokusunda resveratrol ve stobadin maddelerinin verildiği deney gruplarıyla, genç kontrol ve yaşlı kontrol grupları arasındaki nitrik oksit, protein karbonil ve GSH düzeylerinin karşılaştırılarak incelenmesi ve yine beyin dokusunda apoptozise bakıldı.

Redükte glutatyon (GSH) düzeyi yaşlı kontrol grubunun beyin dokusunda 38.14 pmol/mg ölçülürken genç kontrol grubunda 58.59 pmol/mg, yaşlı kontrol+resveratrol grubunda 62.58 pmol/mg ve yaşlı kontrol+stobadin grubunda ise 43.44 pmol/mg olarak

ölçüldü. Yaşlı kontrol grubunun GSH seviyesinin deney gruplarının GSH seviyelerinden düşük olması istatistiki olarak anlamlıdır.

Protein karbonil (PCO) düzeyi yaşlı kontrol grubunun beyin dokusunda 0.31 pmol/mg ölçülürken, genç kontrol grubunda 0.22 pmol/mg, yaşlı kontrol+resveratrol grubunda 0.24 pmol/mg ve yaşlı kontrol+stobadin grubunda ise 0.21 pmol/mg olarak ölçüldü. Yaşlı kontrol grubunun PCO seviyesinin deney gruplarının PCO seviyelerinden yüksek olması istatistiki olarak anlamlıdır

Nitrik oksit düzeyi yaşlı kontrol grubunun beyin dokusunda 94.83 pmol/mg ölçülürken, genç kontrol grubunda 57,61 pmol/mg, yaşlı kontrol+resveratrol grubunda 80.92 pmol/mg ve yaşlı kontrol+stobadin grubunda ise 59.72 pmol/mg olarak ölçüldü. Yaşlı kontrol grubunun nitrik oksit seviyesinin deney gruplarının nitrik oksit seviyelerinden yüksek olması istatistiki olarak anlamlıdır.

Yapılan apoptozis analizi sonucunda tüm gruplarda bantlaşma görülmüştür. Bu durum fizyolojik bir süreç olan apoptozis olgusunun tüm gruplarda hala devam ettiği ve yaşlanmanın henüz çok ileri safhalarda olmadığını düşündürmektedir.

İmmünoblot analizi sonucunda ise kaspaz3 aktivitesi tüm gruplarda görülmüş olup apoptozis sonuçlarını destekler niteliktedir.

## **SUMMARY**

In this study, the effect of resveratrol and stobadine was investigated in old female rabbits brain damage. Rabbits split into four groups. Groups which include young control, old control, old control + resveratrol and old control + stobadine. Young control, old control and old control + stobadine groups which include 3 rabbits; old control + resveratrol group which include 5 rabbits. In this study on old rabbit brain tissues, it has been measured that levels of reduced glutathione (GSH), nitric oxide (NO), protein carbonyl (PCO) and amount of protein. Moreover apoptosis was examined in brain tissue. According to the results, it has been determined that amount of increase in GSH on young control, old kontrol+resveratrol and old control+stobadine were statistically significant as compared to the old control group. It has also been determined that amount of decrease in NO on young control, old control+resveratrol and old control+stobadine were statistically significant as compared to the old control group. It has also been determined that amount of decrease in PCO on young control, old control+resveratrol and old control+stobadine were statistically significant as compared to the old control group.