T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKSİDATİF STRESE BAĞLI ERKEN YAŞLANMA ÜZERİNE ŞELİDONİK ASİT ETKİNLİĞİNİN IN VITRO-IN VIVO İNCELENMESİ

Burcu TÜRKOĞLU

DOKTORA TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş Danışman

Doç. Dr. Emel SERDAROĞLU KAŞIKÇI

Eylül, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKSİDATİF STRESE BAĞLI ERKEN YAŞLANMA ÜZERİNE ŞELİDONİK ASİT ETKİNLİĞİNİN IN VITRO-IN VIVO İNCELENMESİ

Burcu TÜRKOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 23.09.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Doktora Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU Yıldız Teknik Üniversitesi Danışman	Doç. Dr. Emel SERDAROĞLU KAŞIKÇI Üsküdar Üniversitesi Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Ayşegül ERDEMİR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Filiz VARDAR, Üye
Marmara Üniversitesi _____

Prof.Dr.Pınar ATUKEREN, Üye
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa _____

Danışmanım Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Oksidatif Strese Bağlı Erken Yaşlanma Üzerine Şelidonik Asit Etkinliğinin In Vitro-In Vivo İncelenmesi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Burcu TÜRKOĞLU

İmza

Bu çalışma, “Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü’nün FBA 2021/4494 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Biricik oğluma

TEŞEKKÜR

Tezimi hazırlarken bana her aşamada destek olan, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen birçok değerli insana teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Öncelikle, doktora sürecim boyunca bana rehberlik eden, akademik anlamda gelişimime büyük katkılar sağlayan tez danışmanım Prof. Dr. Banu Mansuroğlu'na en içten teşekkürlerimi sunarım. Onun değerli katkıları, sabrı, desteği ve yol göstericiliği bu tezin ortaya çıkmasında büyük rol oynamıştır.

Tez izleme komitesinde yer alan Doç. Dr. Ayşegül Erdemir ve Prof. Dr. Filiz Vardar'a, verdikleri kıymetli öneriler ve yönlendirmeler için teşekkür ederim. Onların katkıları sayesinde çalışmam daha derinlemesine bir perspektife kavuştu. Aynı zamanda tez savunmamda jüri üyeliği yapan ve önemli geri bildirimlerde bulunan Prof. Dr. Semiha Erişen ve Prof. Dr. Pınar Atukeren'e de destekleri için minnettarım.

Bu süreçte bana ve çalışmama sunduğu imkanlar ve destekler için, başta Yıldız Teknik Üniversitesi Rektörü Prof. Dr. Tamer Yılmaz olmak üzere, tüm Yıldız Teknik Üniversitesi ailesine ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne teşekkür ederim. Ayrıca, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü ailesine teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmalarım sırasında hücre temini ve diğer deneysel aşamalarda bana her zaman yardımcı olan İpek Bulut ve Maide Şeker'e ve onların değerli hocalarına gönülden teşekkür ederim. Laboratuvarda beraber çalıştığım değerli arkadaşlarım, yüksek lisans öğrencileri Aysu Eker ve Aysun Kaplan ile doktora öğrencisi Cansu Tatar'a, varlıkları ve yardımlarıyla beni destekledikleri için minnettarım. Ayrıca laboratuvarda sarf malzeme ve kimyasal temininde her daim yanımda olan Derya Erdoğan, Cansu Koç ve İbrahim Yaman'a da teşekkürlerimi sunarım.

Akademisyenlik mesleğini seçmeme vesile olan ve her daim bu yolda beni destekleyen kıymetli büyüğüm Mustafa Talat Ölmez'e, bu süreçte bana her zaman moral kaynağı olan ve yanımda bulunan can yoldaşım, eşim Cüneyt Türkoğlu'na, bu süreçte çocuk kalbiyle bir yetişkin kadar olgun ve fedakar davranan, bu hayatta en kıymetli ve eşsiz varlığım bir filizden bir fidan'a dönüştüğünü gördükçe tarifsiz heyecan ve mutluluk duyduğum sevgili oğlum Mustafa Sinan Türkoğlu'na, her zaman dualarıyla ve sevgisiyle bana güç veren annem ve babama, desteklerini her an hissettiğim abime şükranlarımı sunarım. Oğlumu gözüm arkada kalmadan güvenle emanet edebildiğim ve bu sayede tez çalışmalarımı yürütebildiğim Bedriye Yazıcı ve ailesine, ayrıca bu süreçte desteğini esirgemeyen kıymetli canlarım Kamer Demircan, Neslihan Atasever ve Gülşen Kölük'e de teşekkür ederim. Bu tezin her aşamasında onların sevgisi ve desteği beni ayakta tuttu.

Bu süreçte katkı sağlayan herkese sonsuz minnettarım, iyi ki varsınız.

Burcu TÜRKOĞLU

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ x

KISALTMA LİSTESİ xi

ŞEKİL LİSTESİ xii

TABLO LİSTESİ xiv

ÖZET xv

ABSTRACT xvii

1 GİRİŞ 1

1.1 Yaşlanma 1

1.2 Yaşlanma Sebepleri 2

1.2.1 Endojen Kaynaklar 2

1.2.2 Eksojen Kaynaklar 5

1.3 Yaşlanma Teorileri 7

1.3.1 Programlı Yaşlanma Teorileri 7

1.3.2 Hasarlı Yaşlanma Teorileri 9

1.4 Hücre Döngüsü 11

1.5 Hücre Döngüsünün Kontrolü 12

1.5.1 Sikline Bağımlı Kinaz (CDK) Düzenlemesi 12

1.5.2 Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları 14

1.5.3 E2F Transkripsiyon Faktörleri Ailesi 16

1.5.4 Retinoblastoma Ailesi Üyeleri 16

1.5.5 Anafazı Teşvik Edici Kompleks/Siklozom 17

1.6 Hücresel Senesens 17
1.7 Senesens İlişkili Morfolojik Değişiklikler ve Markırlar..... 19
1.7.1 Morfolojik Özellikler 19
1.7.2 Senesens ile İlişkili Beta-Galaktozidaz (SA-β-gal) 20
1.7.3 Senesens ile İlişkili Heterokormatin Odakları (SAHF) 21
1.7.4 Senesens İlişkili Fenotipler (SASP) 21
1.7.5 DNA Hasarı Yanıtı 23
1.7.6 Apoptoz ve Senesens 24
1.8 Hücresel Senesens İlişkili Hastalıklar 25
1.8.1 Diyabet ve Dislipidemi 25
1.8.2 Kardiyovasküler Hastalıklar 26
1.8.3 Kanser 26
1.8.4 Böbrek Hastalıkları 26
1.8.5 Karaciğer Hastalıkları 26
1.8.6 Osteoartrit 27
1.8.7 Akciğer Hastalıkları 27
1.8.8 Nörolojik Hastalıklar 27
1.9 Hücresel Senesens Hedefleme Terapötik Stratejiler 27
1.9.1 Senomorfik Ajanlar 27
1.9.2 Senolitik Ajanlar 28
1.10 Piron Yapısına Sahip Organik Asitler 28
1.11 Şelidonik Asit 29
1.12 Senesens Deney Modelleri 30
1.12.1 In Vitro Senesens Deney Modelleri 30
1.12.2 In Vivo Senesens Deney Modelleri 32
2 MATERYAL-METOD **34**

2.1 In Vitro Materyal-Metod 34
2.1.1 Materyal 34
2.1.2 Hücre Kültürü Çalışmaları 38
2.1.3 BJ İnsan Fibroblast Hücreleri Complete Medium Hazırlanması 41
2.1.4 Dondurulmuş Hücrelerin Çözdürülmesi 41
2.1.5 Hücrelerin Pasajlanması ve Subkültüre Edilmesi 43
2.1.6 Hücrelerin Dondurulması 45
2.1.7 Biyokimyasal Analizler İçin Hücre Lizatı Hazırlama 45
2.1.8 Oksidatif Stres Kaynaklı Yaşlanma Modelinin Geliştirilmesi 46
2.1.9 Serbest Radikal ve Antioksidan Aktivite Ölçümleri 49
2.1.10 Gen Ekspresyonu ve Protein Analizi 62
2.1.11 Bikinkoninik Asit (BCA) Protein Testi 72
2.2 In Vivo Materyal-Metod 73
2.2.1 In Vivo Çalışmalar 73
3 BULGULAR **76**
3.1 Oksidatif Stress Kaynaklı Erken Yaşlanma (SIPS) Modeli Geliştirilmesi 76
3.1.1 İkiye Katlanma Süresinin Hesaplanması 76
3.1.2 Senesens β-galaktozidaz Boyama 76
3.1.3 Hidrojen Peroksit'in Oksidatif Stres Ajanı Subletal Doz Tayini 78
3.1.4 Şelidonik asit (CA) Subletal Doz Tayini 79
3.2 Serbest Radikal ve Antioksidan Aktivite Tayini 80
3.2.1 Senesens β-galaktozidaz Boyama 80
3.2.2 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-Akridin Orange (AO) Boyama 81
3.2.3 Genotoksisite Analizi: Comet Testi 85
3.2.4 Hidrojen Peroksit Seviyesi Ölçüm Sonuçları 87

3.2.5 Malondialdehit Miktar Tayini Sonuçları 88
3.2.6 Glutatyon Peroksidaz Aktivite Tayini Sonuçları 90
3.2.7 Süperoksit Dismütaz Aktivite Tayini Sonuçları 91
3.3 Gen Ekspresyon ve Protein Analiz Sonuçları 92
3.3.1 RT PCR Sonuçları 92
3.3.2 Western Blot Protein Analiz Sonuçları 112
3.3.3 Bikinkoninik Asit (BCA) Protein Testi Sonuçları 115
3.4 In Vivo Sonuçlar 116
3.4.1 Yeni Obje Tanıma Testi 116
4 SONUÇ 119
4.1 Sonuçlar 119
KAYNAKÇA 133
A ETİK KURUL KARARI 158
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 159

SİMGE LİSTESİ

λmax	Lambda max
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
pH	Potential of hydrogen
~	Yaklaşık sembolü

KISALTMA LİSTESİ

BCA	Bikinkoninik asit
BSA	Sığır serum albumin
CAT	Katalaz
DMEM	Dulbecco′s Modifiye Eagle′s Besiyeri
DMSO	Dimetil sülfoksit
FBS	Fetal Sığır Serum
G-Px	Glutatyon peroksidaz
GSH	Redükte Glutatyon
MDA	Malondialdehit
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
OD	Optik Dansite
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reactive Oksijen Türleri
SF	Serum Fizyolojik
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiobarbitürik Asit
TCA	Trikarboksilik Asit

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 Kronolojik ve biyolojik yaş ve bunların metilasyon saatleri ile değerlendirilmesi [9]. **2**

Şekil 1.2 Hücre döngüsünün aşamaları. Düzenleyici CDK/siklin komplekslerinin aktivite bölgesi de belirtilmiştir [106]. **12**

Şekil 1.3 Hücresel senesens oluşumu ile ilişkili yolaklar (Kegg pathway database) **18**

Şekil 1.4 Senesens ve ilişkili yolaklar (https://cytoscape.org/) **19**

Şekil 1.5 Chelidonium majus L. bitkisi (http://yabanicicekler.com/flower/chelidonium-majus-528) **29**

Şekil 1.6 Şelidonik asit kimyasal yapısı (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chelidonic-acid) **30**

Şekil 2.1 BJ Fibroblast hücreleri hücre hattı mikroskop görüntüsü **(**https://www.atcc.org**)** **40**

Şekil 2.2 BJ fibroblast hücre canlılığı kontrolü **42**

Şekil 2.3 BJ fibroblast hücre hattının çoğaltılması **44**

Şekil 3.1 Hücre sayısının ikiye katlanma süresi grafiği **76**

Şekil 3.2 Beta-galaktozidaz boyama kantifikasyonu % grafiği **77**

Şekil 3.3 3, 6 ve 9. Gün temsili Beta-galaktosidaz boyama faz kontrast mikroskop analiz görselleri **78**

Şekil 3.4 3 saat H_2O_2 uygulaması mtt testi sonuç grafiği **79**

Şekil 3.5 24, 48 ve 72 saat CA uygulaması hücre canlılığı MTT testi sonuçları grafiği **80**

Şekil 3.6 Temsili Beta-galaktozidaz boyama faz kontrast mikroskop analiz görselleri **81**

Şekil 3.7 Beta-galaktozidaz boyama kantifikasyon % grafiği **81**

Şekil 3.8 Temsili DAPI floresan boyama faz kontrast mikroskop analiz görselleri **83**

Şekil 3.9 Nükleer alanın DAPI boyama görüntülerinin kantitatif analizi **83**

Şekil 3.10 Temsili akridin orange boyama faz kontrast mikroskop analiz görselleri **84**

Şekil 3.11 Akridin orange boyasıyla boyanmış hücrelerde lizozomal aktivite kırmızı floresans kantitatif analizi **85**

Şekil 3.12 Temsili Comet testi floresans mikroskop analizi görselleri **86**
Şekil 3.13 Comet testi kantitatif analizi **87**
Şekil 3.14 H_2O_2 seviyesi ölçümü grafiği **88**
Şekil 3.15 MDA seviyesi ölçümü grafiği **90**
Şekil 3.16 GSH seviyesi ölçümü grafiği **91**
Şekil 3.17 SOD seviyesi ölçümü grafiği **92**
Şekil 3.18 Kontrol grubu total rna bütünlük numarası **93**
Şekil 3.19 H_2O_2 grubu total rna bütünlük numarası **94**
Şekil 3.20 250 µM CA grubu total rna bütünlük numarası **95**
Şekil 3.21 500 µM CA grubu total rna bütünlük numarası **96**
Şekil 3.22 p21 gen ekspresyonu analiz grafiği **98**
Şekil 3.23 p16 gen ekspresyonu analiz grafiği **99**
Şekil 3.24 pRB1 gen ekspresyonu analiz grafiği **100**
Şekil 3.25 p53 gen ekspresyonu analiz grafiği **102**
Şekil 3.26 SIRT1 gen ekspresyonu analiz grafiği **103**
Şekil 3.27 PARP1 gen ekspresyonu analiz grafiği **104**
Şekil 3.28 APEX1 gen ekspresyonu analiz grafiği **106**
Şekil 3.29 Nrf2 gen ekspresyonu analiz grafiği **107**
Şekil 3.30 AMPK gen ekspresyonu analiz grafiği **108**
Şekil 3.31 BAX gen ekspresyonu analiz grafiği **110**
Şekil 3.32 CytC gen ekspresyonu analiz grafiği **111**
Şekil 3.33 p21 (a) Western blot bant görseli (b) p21 protein seviyesi densitometrik analizi **113**
Şekil 3.34 p16 (a) Western blot bant görseli (b) p16 protein seviyesi densitometrik analizi **114**
Şekil 3.35 pRB1 (a) Western blot bant görseli (b) pRB1 protein seviyesi densitometrik analizi **115**
Şekil 3.36 BCA standart eğri grafiği **116**
Şekil 3.37 Kısa süreli tanıma sonuç grafiği **117**
Şekil 3.38 Uzun süreli tanıma sonuç grafiği **118**

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Siklin-CDK kompleksleri hücre döngüsünün belirli noktalarında aktive edilir [128]. **14**
Tablo 1.2 SASP faktörlerinin sınıflandırılması ve işlev listesi [197] **22**
Tablo 1.2 SASP faktörlerinin sınıflandırılması ve işlev listesi (Devamı)..... **23**
Tablo 2.1 Kullanılan kimyasal listesi..... **34**
Tablo 2.1 Kullanılan kimyasal listesi (Devamı)..... **35**
Tablo 2.1 Kullanılan kimyasal listesi (Devamı)..... **36**
Tablo 2.2 Kullanılan sarf malzeme listesi..... **36**
Tablo 2.2 Kullanılan sarf malzeme listesi (Devamı)..... **37**
Tablo 2.3 Kullanılan cihaz listesi..... **37**
Tablo 2.3 Kullanılan cihaz listesi (Devamı)..... **38**
Tablo 2.4 Çalışmada kullanılan hücre tipi ve hücrenin özellikleri **40**
Tablo 2.5 Standart eğri dilüsyonları..... **56**
Tablo 2.6 Çalışmada kullanılan primer özellikleri..... **63**
Tablo 2.7 RT reaksiyon karışım bileşenleri **66**
Tablo 2.8 cDNA reaksiyonunun termal çevrim koşulları. **67**
Tablo 2.9 Çoklu kuyucuklu qPCR için reaksiyon karışımı..... **68**
Tablo 2.10 Western blot jel yükleme bir örnekiçin gerekli hesaplama **70**
Tablo 2.11 In Vivo Deney Grupları..... **74**

ÖZET

Oksidatif Strese Bağlı Erken Yaşlanma Üzerine Şelidonik Asit Etkinliğinin In Vıtro-In Vıvo İncelenmesi

Burcu TÜRKOĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı
Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş-Danışman: Doç. Dr. Emel SERDAROĞLU KAŞIKÇI

Bu çalışma, Şelidonik asidin (CA) hidrojen peroksit (H_2O_2) ile indüklenen hücresel yaşlanma üzerindeki etkilerini insan deri fibroblast hücrelerinde (BJ) araştırmıştır. Hücresel yaşlanma, yaşa bağlı hastalıklar ve kronik durumlarla ilişkili kritik bir mekanizmadır. Geniş farmakolojik aktivitesi ile bilinen bir γ-piron bileşiği olan CA, oksidatif stresi hafifletme ve yaşlanma belirteçlerini değiştirme potansiyeli açısından değerlendirilmiştir. Oksidatif stres ajanı H_2O_2 kullanılarak BJ fibroblast hücrelerinde stres kaynaklı erken yaşlanma (SIPS) modeli oluşturulmuştur. Bu tedaviden sonra hücreler CA ile tedavi edilmiş ve CA'nın yaşlanma üzerindeki potansiyel etkisi, yaşlanma ile ilişkili β-galaktozidaz, 4′,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), akridin turuncusu boyaması (AO), comet testi, gen ekspresyonu ve protein analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, CA'nın yaşlanma ile ilişkili β-galaktozidaz aktivitesi, DNA hasarı, lizozomal aktivite ve malondialdehit gibi oksidatif stres göstergeleri de dahil olmak üzere yaşlanma belirteçlerini etkili bir şekilde azalttığını göstermiştir. Gen ekspresyonu ve protein analizleri, p16, p21,

pRB1 ve p53 ekspresyonlarının modüle edilmesi ve oksidatif stres belirteçlerinin azaltılması ile gözlemlenen anti-senesens etkilerini desteklemiştir. Sonuç olarak, CA'nın senolitik ve senomorfik etkilere sahip olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Şelidonik asit, senesens, senolitik, senomorfik, oksidatif stres, H_2O_2, prematüre senesens, BJ Fibroblast.

ABSTRACT

In Vitro-In Vivo Investigatıon Of The Effect Of Chelıdonıc Acıd Oxıdatıve Stress-Induced Premature Senescence

Burcu TÜRKOĞLU

Department of Molecular Biology and Genetics
Molecular Biology and Genetics Program
Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emel SERDAROĞLU KAŞIKÇI

This study investigated the effects of chelidonic acid (CA) on hydrogen peroxide (H_2O_2) induced cellular senescence in human skin fibroblast cells (BJ). Cellular senescence is a critical mechanism that is linked to age-related diseases and chronic conditions. CA, a γ-pyrone compound known for its broad pharmacological activity, was assessed for its potential to mitigate oxidative stress and alter senescence markers. A stress-induced premature senescence (SIPS) model was designed in BJ fibroblast cells using the oxidative stress agent H_2O_2. After this treatment, cells were treated with CA, and the potential effect of CA on senescence was evaluated using senescence-related β-galactosidase, 4′,6-diamino-2-phenylindole (DAPI), acridine-orange staining (AO), comet assay, gene expression, and protein analysis. These results demonstrate that CA effectively reduces senescence markers, including senescence-associated β-galactosidase activity, DNA damage, lysosomal activity, and oxidative stress indicators such as malondialdehyde. Gene expression and protein analyses corroborated the observed

anti-senescent effects, with CA modulat-ing p16, p21, and pRB1 expressions and reducing oxidative stress markers. In conclusion, CA appeared to have senolytic and senomorphic potential in vitro, which could mitigate and reverse SIPS markers in BJ fibroblasts.

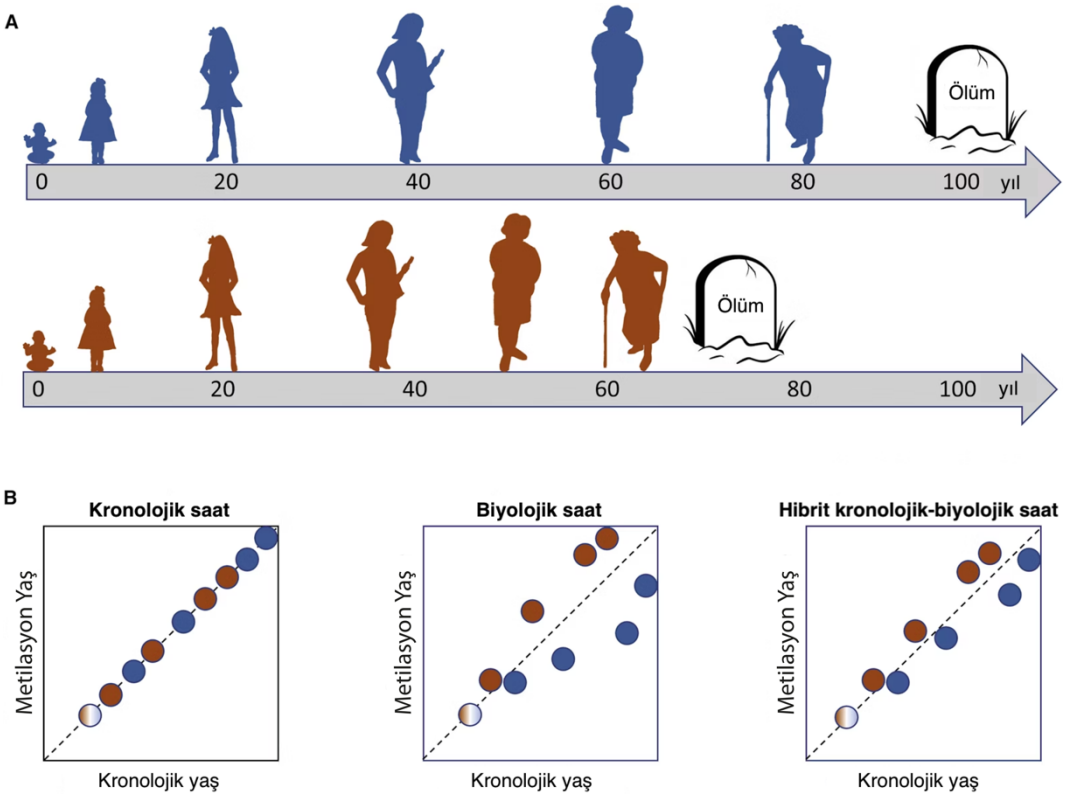
Keywords: Chelidonic acid, senescence, senolytic, senomorphic, oxidative stress, H_2O_2, premature senescence, BJ Fibroblasts.

1
GİRİŞ

1.1 Yaşlanma

Yaşlanma ve evrim, yaşamın yaklaşık 3,5 milyar yıl önce kendiliğinden ortaya çıkmasıyla başlamıştır [1]. Yaşlanma, ilerleyen yaşla birlikte hücre ve dokularda hastalık ve ölüm riskini artıran çeşitli zararlı değişikliklerin birikmesidir. Bazı değişiklikler [2, 3] kalıtsaldır, çoğunluğu ise ilerleyen yaşla birlikte ortaya çıkarak hastalık ve ölüm olasılığını artırır. Bu yaşlanmaya bağlı meydana gelen değişiklikler evrimi sağlar. Sağlık hizmetlerindeki ilerlemelere bağlı olarak küresel yaşam beklentisinin artması, yaşlanma ve yaşlanmayla ilişkili hastalıkların (ARD) görülme sıklığının ve yükünün artmasına neden olmuştur. 2050 yılına kadar, 65 yaş üstü yaşlı nüfusun küresel olarak 1,6 milyar olacağı ve kırılgan yaşlı nüfusa sosyoekonomik bir yük getireceği tahmin edilmektedir [4]. Kronolojik yaş, tanımı gereği, bir bireyin yaşadığı yıl sayısının bir ölçüsüdür. Yine de, insanların fizyolojik olarak farklı oranlarda yaşlandıkları ve aynı kronolojik yaştaki bireylerin farklı biyolojik yaşları olabileceği takdir edilmektedir. Bu nedenle, bireyin genel fizyolojik performans durumu ve sağlık durumu için bir gösterge olan biyolojik yaşı, kronolojik yaşından farklı olabilir [5], normal yaşlanmaya kıyasla daha hızlı veya daha yavaş yaşlanma hızı gösterir (Şekil 1.1). Biyolojik yaşının kronolojik yaştan sapması, daha genç ya da daha yaşlı olması, bireyin biyofizyolojik yaşlanma durumunu yansıtır. Bu nedenle, biyolojik yaşı kullanmak, bir bireyin sağlık/hastalık durumunu ve kronolojik yaşına kıyasla yaşlanma sürecini tahmin etmenin daha doğru bir yolu olmalıdır [6]. Yaşlanma araştırmalarındaki en büyük zorluk, bir bireyin biyolojik yaşının doğru ölçümlerinin tanımlanmasıdır [7]. Yaşlanmayla birlikte, daha önce çoğalma yetkinliğine sahip hücrelerin çoğalma kapasitesi azalır ve bu da hücresel senesense yol açar. Bu, yaşlanmaya ve ARD'ye katkıda bulunan

kritik bir mekanizmadır; çoğalan veya farklılaşmış bölünmeyen hücrelerin hücresel stresi, replikatif durma, apoptoz direnci ve pro-fibrotik, proinflamatuar ve proinflamatuar doku yıkıcı senesens ile ilişkili salgı fenotipi (SASP) ile sonuçlanır [8].



Şekil 1.1 Kronolojik ve biyolojik yaş ve bunların metilasyon saatleri ile değerlendirilmesi [9].

1.2 Yaşlanma Sebepleri

1.2.1 Endojen Kaynaklar

1.2.1.1 Genetik Faktörler

Genetik yatkınlık, yaşlanma sürecinde önemli bir rol oynar. Belirli genler, yaşlanma sürecini etkileyebilir. Örneğin, bazı genetik varyasyonlar hücrelerin onarım yeteneğini etkileyebilir veya antioksidan savunma mekanizmalarını zayıflatabilir, böylece yaşlanma belirtileri daha hızlı ortaya çıkabilir. Süperoksit dismutaz gibi endojen antioksidanların yaşlanma süreçlerini ve lökosit telomer kısalmasını engellediği düşünülmektedir [10]. Araştırmalar, nükleer faktör (eritroid türevli2) benzeri 2'nin (NRF2), genleri transkripsiyonel olarak yukarı doğru düzenleyerek stresle mücadele ettiğini göstermiştir. NRF2 kaybı, sınırsız oksidatif strese neden

olur ve yaşlanma fenotipini yönlendirir. Çoğu endojen antioksidan, yalnızca NRF2 aktive edildiğinde eksprese edilir [11-13]. Telomerler kromozomal DNA'nın uçlarında yer alır. TTAGGG dizisinin tandem tekrarlarından ve ilişkili proteinlerden oluşurlar. Telomerler tekrarlanan hücre bölünmeleriyle kısalır ve kritik bir telomer uzunluğuna ulaşıldığında hücre yaşlanmaya ve ardından apoptoza girer. Bu nedenle, telomerler potansiyel bir biyolojik saat olarak kabul edilir [14-16]. Telomer uzunluğu büyük ölçüde kalıtsaldır ve yaşam boyunca çeşitli içsel ve çevresel faktörler tarafından modüle edilir. Telomer dinamikleri karmaşıktır ve genetik faktörlerden güçlü bir şekilde etkilenir [17]. İnsan telomer uzunluğunun kalıtsallığı, daha önce gözden geçirildiği gibi [17, 18], telomer uzunluğundaki bireyler arası varyasyonu kısmen açıklayan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Replikatif senesensi tetikleyenler, genler, hücre bölünmesi, DNA hasarı ve oksidatif stres gibi telomer kısalmasını hızlandıran faktörlerdir. Bu faktörler, tespit edilebilir nükleer odaklar veya 'DNA-SCARS' (senesensi güçlendiren kromatin değişikliklerine sahip DNA segmentleri), [19-21] ve tümör baskılayıcı p16 ve p53 yolaklarını tetikleyen DNA hasarı yanıt sinyallerini ortaya çıkarır [22]. Doğumdaki Lökosit telomer uzunluğu (LTU) ve yaşlanma sırasındaki telomer yıpranması LTU dinamiklerinin başlıca belirleyicileridir. LTU doğumda en uzundur, ergenlik dönemine kadar hızla kısalır ve ardından yaşlılığa kadar daha yavaş bir oranda kısalır [23]. Doğumdaki LTU kalıtsaldır [17] ve doğum ağırlığı ile ters orantılıdır. Doğumdaki LTU'nun yetişkin yaştaki LTU'yu yansıtması muhtemeldir [17, 23] ve bu nedenle yaşamın ilerleyen dönemlerinde yaşlanma ile ilişkili hastalıklarla bir ilişkiyi öngörebilir. LTU, hem doğumda hem de yaşam boyunca bireyler arasında oldukça değişkendir [24].

1.2.1.2 Hücresel Senesens

Hücrelerin bölünme yeteneği sınırlıdır ve bu süreç yaşlandıkça azalır. Bu, hücrelerin tamir ve yenilenme yeteneklerinin zayıflamasına ve yaşlanma belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olabilir. Hücrelerdeki DNA hasarları ve telomerlerin (kromozom uçlarındaki koruyucu yapılar) kısalması da yaşlanmaya katkıda bulunur. Hücresel yaşlanma, çeşitli streslerden kaynaklanan ve geri dönüşü olmayan bir büyüme durması durumuna yol açan bir süreçtir. Yaşlanan hücreler yaşlanma sırasında birikir ve yaşa bağlı çeşitli hastalıkların oluşmasında rol oynar [25]. Bir fare yaşlanma modelinde yaşlanan hücrelerin ortadan kaldırılması, yaşa

bağlı patolojileri geciktirdiği gözlenmiştir [26]. İntrinsik ve ekstrinsik olaylar, hücre homeostazının bozulma seviyesine [27] ve p53 aktivitesine [28] bağlı olarak hücre yaşlanmasını veya apoptoz sürecini indükleyebilir. Yaşlanan hücreler tarafından salgılanan moleküller (sekretoma), otokrin ve parakrin aktiviteler [25] yoluyla, epigenom [29], gen ifadesi, protein işleme ve metabolik kontrol [30] gibi birçok seviyede etki ederek doku homeostazını korumak için derinlemesine işbirliği yapar. Ayrıca, spesifik mitokondriyal yollar, mitokondriyal redoks durumunun değiştirilmesi yoluyla yaşlanma sürecinin hazırlanmasına katkıda bulunur [25, 31]. Senesens sekretomu, embriyogenez sırasında doku yeniden şekillenmesi, yara iyileşmesinde doku onarımı ve yaşlanmanın indüklenmesi gibi fizyolojik ve patolojik olayların yanı sıra farklı organizmaların yaşa bağlı hastalıklarında da rol oynar [32].

1.2.1.3 Hormonal Değişiklikler

Hormonlar, vücudun metabolik ve üreme faaliyetlerini düzenleyen kimyasal mesajcılardır. Hormonların dengesizliği, vücutta önemli sağlık sorunlarına yol açabilir. Yaşlanma süreci hormon seviyelerinde hafif değişikliklere neden olurken, çevresel kirleticiler, yaşam tarzı değişiklikleri ve stres gibi faktörler bu dengesizliği daha da artırabilir. İlaçlar da hormon seviyelerini etkileyebilir. Bu hormon dengesizlikleri, çeşitli hastalıklara ve yaşam süresinin kısalmasına yol açabilir [33].

1.2.1.4 Metabolik Değişiklikler

Yaşlanma ve ölüm, türlerin adaptasyonu ve gelişimi için gerekli olan doğal süreçlerdir. Bu süreçlerin seyri, bireysel olarak şekillenen enerji metabolizması tarafından yönlendirilir. Ontogeni süresince enerji metabolizmasında önemli değişiklikler meydana gelir. Artan kanıtlar, yaşlanma sürecinin hipotalamusun işlevselliğinde yaşa bağlı olarak meydana gelen düşüşle merkezi olarak başlatıldığını ve kontrol edildiğini öne sürmektedir. Bunun sonucunda, organizmanın, dokuların ve hücrelerin enerji metabolizması kademeli olarak azalır ve nihayetinde apoptoz, yani programlanmış hücre ölümü ile son bulur [34]. Bununla birlikte, artan enerji harcamasının da daha iyi sağlık ve daha uzun yaşam ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Vücut sıcaklığının azalması daha uzun yaşam süresi ile ilişkilendirilmiştir. Ancak, termojenik (kahverengi veya bej) yağ dokusunun işlevine dair son bulgular, termojenez için harcanan enerjiyi artırarak, metabolik

sağlığı iyileştirme ve yaşam süresini uzatma konularına yoğun ilgi çekmiştir. Mevcut kanıtlar, farmakolojik, çevresel veya genetik müdahalelerle yağ dokusu termojenezinin artırılmasının, metabolik sağlık üzerinde önemli faydalar sağlayabileceğini ve sağlıklı yaşlanma ile uzun yaşam şansını artırabileceğini göstermektedir [35].

1.2.2 Eksojen Kaynaklar

1.2.2.1 Güneş Işığı

Güneş radyasyonu, sırasıyla %6, %40 ve %54 oranlarında UV radyasyonuna (UVR), görünür ışık ve kızılötesi ışınlardan oluşur. UVR, dalga boyuna göre üç kategoriye ayrılabilir: UVA (320–400 nm), UVB (280–320 nm) ve UVC (100–280 nm) [36]. UVR, dışsal cilt yaşlanmasının gelişiminde birincil çevresel faktördür. Akut UVR maruziyeti, ciltte katalaz aktivitesini azaltır ve protein oksidasyonunu artırır. Çevresel faktörler arasında, UVR'nin cilt kanseri ve cilt yaşlanmasının gelişiminde %80'e kadar katkıda bulunduğu ve en önemli çevresel faktör olduğu tahmin edilmektedir. Aşırı UVR maruziyeti, ciltte hücresel, genetik ve moleküler değişikliklere yol açabilir ve bu da foto yaşlanma olarak bilinen hızlanmış cilt yaşlanmasına neden olabilir [37]. Cildin UVR'ye maruz kalması, süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) fotokimyasal olarak üretilmesini tetikler [38]. ROS'lar ciltte sürekli olarak üretilir ve fizyolojik süreçlere dahil olur, ancak UVR'ye maruz kalma sonrasında yüksek ROS konsantrasyonlarının zararlı etkilerine dair giderek artan kanıtlar vardır. Cilt, ROS'un zararlı etkilerini dengelemek için antioksidanlar üretir; ancak UVR'ye maruz kalma sonrasında oluşan daha yüksek ROS konsantrasyonları, hücresel antioksidan savunma sistemlerinde dengesizliğe yol açarak oksidatif strese neden olabilir [38]. Dışsal olarak yaşlanmış cilt genellikle yüz, göğüs ve kolların ekstansör yüzeylerinde görülür ve ömür boyu birikmiş UVR maruziyetinin kümülatif etkilerinden kaynaklanır. Foto-yaşlanmış cildin klinik sunumu, kırışıklıklar, pigmente lezyonlar (örneğin, efelidler, lentiginler ve yama tarzı hiperpigmentasyon) ve depigmente lezyonlar (örneğin guttat hipomelanoz) gibi belirtileri içerir. Glogau foto-yaşlanma ölçeği'nde, güneşe uzun süre maruz kalmış hastalar, yaşlarına göre beklenenden daha yüksek bir puan alabilirken, minimal güneş maruziyeti olan hastalar, yaşlarına göre daha düşük bir puan alabilir [39].

1.2.2.2 Sigara İçmek

Yaşam tarzı tercihleri birçok hastalığa sebep olabilir. Sigara içmek yaşlanmaya bağlı ortaya çıkan kronik durumlar için başlıca risk faktörlerinden birisidir [40]. Tütün kullanımının yaygınlığında önemli düşüşler görülmesine rağmen, sigara içmek hâlâ Amerika Birleşik Devletleri'nde erken morbidite (hastalık) ve mortalitenin (ölüm) önde gelen nedenidir [41]. Sigara içmek, ciltteki kılcal damar kan akışını azaltarak cilt hasarına neden olur; bu da cilt dokularında oksijen ve besin yoksunluğuna yol açar. Sigara içenlerin dermisinde daha az kollajen ve elastin lifleri bulunduğu, bu durumun cildin gevşek, sert ve daha az elastik hale gelmesine neden olduğu gösterilmiştir. Sigara dumanı, akciğer dokusundaki kollajen ve elastine zarar verir ve aynı şekilde ciltte de hasara yol açabilir [42].

1.2.2.3 Beslenme

Yaşlanma süreci esnek olup, iyi beslenme, yeterli fiziksel aktivite ve sigaradan kaçınma gibi yaşam tarzı faktörleriyle yavaşlatılabilir. İnsanlarda, Akdeniz diyeti gibi bitki bazlı diyetler, daha sağlıklı yaşlanma ve yaşa bağlı hastalık riskinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Buna karşın, obezite senesensi hızlandırır ve kardiyovasküler hastalıklar (CVD), tip 2 diyabet (T2D), demans, kas-iskelet sistemi hastalıkları ve çeşitli kanserler gibi en yaygın karmaşık hastalıkların olasılığını artırır. Daha iyi beslenme kalıplarının senesensi en az iki yolla yavaşlatması muhtemeldir: (i) iltihaplanma, oksidatif stres/redoks değişiklikleri ve metabolik stres gibi yaygın zararlı süreçleri azaltarak ve (ii) hücresel hasar yönetimi ve onarım kapasitesini artırarak [43].

1.2.2.4 Stres

Yaşlanma ve stres tepkisinin karmaşık süreçlerinin birçoğu hala tam olarak anlaşılamamıştır; buna rağmen, araştırmalar bu süreçler arasında organizasyonun her seviyesinde, organ sistemleri kadar büyük yapılar veya hücre içi yollar ve gen adayları kadar küçük yapılar arasında ortak yollar olduğunu öne sürmeye devam etmektedir. Yaşlanma ve stres tepkisi süreçlerinde yer alan ve sıkça ilişkilendirilen bileşenlerden biri de transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-kappa B'dir (NF-κB). NF-κB, hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklığın düzenlenmesinde rol oynayan bir transkripsiyon faktörleri ailesidir [44]. NF-κB'nin düzensizliği otoimmün hastalıklara ve kansere yol açar, ancak aynı zamanda yaşlanma ve stresle

ilişkili bir faktör olarak da incelenmektedir. Psikolojik stresin hücre içi düzeye aktarılması ve NF-κB'nin işlevini etkileyerek bağlanma aktivitesini artırması önerilen mekanizma, stres sırasında artan noradrenalin konsantrasyonlarının α1- ve β-adrenerjik reseptörlere bağlanmasıyla aktive edilen bir sinyal yolunu içerir [45]. NF-κB ve stres tepkisi arasındaki bir diğer olası bağlantı, NF-κB'nin glukokortikoid (GC) reseptörleriyle henüz tam olarak açıklanmamış bir şekilde etkileşimidir [46]. Oksidatif stres, büyüme, bağışıklık işlevi ve DNA hasarı gibi pek çok önemli sürece yanıt veren bir transkripsiyon faktörünün, NF-κB gibi, yaşlanmadan etkilenen bileşenlerden biri olarak kabul edilmesi şaşırtıcı değildir. Yaşlanma, bağışıklık ve strese dirençle ilgili diğer moleküler faktörler arasında Forkhead Box Class O (FOXO3a) [47] ve Sirtuin 1 (SIRT1) yer alır [48]. İlginç bir şekilde, her ikisi de NF-κB'nin aktivasyonunu engelleyerek hareket eder, bu da bu faktörün hem yaşlanma hem de stresle olan ilişkisini vurgulamaktadır [49].

1.3 Yaşlanma Teorileri

Başlıca iki tip yaşlanma teorisi vardır: Programlı yaşlanma teorileri ve hasar teorileri.

1.3.1 Programlı Yaşlanma Teorileri

Programlı yaşlanma teorileri, yaşlanmanın insanlarda genetik olarak önceden programlandığı ve doğal bir süreç olduğunu öne süren teorilerdir. Bu teoriler, yaşlanmanın belirli bir süreçte ve belirli bir hızda gerçekleştiğini ve bu sürecin genetik bir düzenlemeye tabi olduğunu savunur. Programlı yaşlanma teorilerine göre, organizmaların yaşam süresi ve yaşlanma süreci, genetik yapılarındaki belirli genlerin etkisiyle belirlenir. Bu genler, hücre bölünmesi, DNA onarımı, enerji üretimi gibi yaşlanma sürecinde önemli rol oynayan mekanizmaları kontrol eder [50]. Bu teoriler, yaşlanma sürecinin genetik düzeyde düzenlenen bir saat gibi çalıştığını ve yaşlanmanın bir tür "program" olduğunu öne sürer [51]. Ancak, yaşlanma sürecini tam olarak açıklayan tek bir teori olmaması nedeniyle, programlı yaşlanma teorileri tartışmalıdır ve diğer yaşlanma teorileriyle birlikte ele alınması gerekmektedir [52].

1.3.1.1 Telomer Teorisi

Programlı yaşlanma teorilerinden biri olan telomer teorisi, ancak aynı zamanda hasarlı yaşlanma teorilerine de katkıda bulunur. Yaşlanmanın ana nedeninin telomerlerin kısalması olduğunu savunur [53]. Telomerler, kromozomların uçlarında bulunan tekrarlanan DNA dizileridir. Hücre her bölündüğünde, telomerler kısalır ve sonunda hücre bölünmesi durur [54-56]. Bu teoriye göre, telomerlerin kısalması zamanla hücrelerin işlevsiz hale gelmesine ve yaşlanma belirtilerinin ortaya çıkmasına yol açar [57].

1.3.1.2 Programlı Hücre Ölümü (Apoptoz) Teorisi

Bu teoriye göre, yaşlanma süreci programlanmış hücre ölümü (apoptoz) mekanizmaları tarafından yönlendirilir. Vücuttaki hücreler, belirli bir yaşa geldiklerinde veya belirli bir süre boyunca bölünme yeteneklerini kaybettiklerinde programlanmış hücre ölümüne uğrarlar [58]. Bu süreç, yaşlanmanın ana nedenlerinden biri olarak kabul edilir [59].

1.3.1.3 İmmünolojik Teori

Bağışıklık sistemi zamanla zayıflamaya programlanmıştır, bu da bulaşıcı hastalıklara ve dolayısıyla yaşlanmaya ve ölüme karşı artan bir savunmasızlığa yol açar. Bağışıklık sisteminin etkinliğinin ergenlikte zirve yaptığı ve daha sonra yaşın ilerlemesiyle kademeli olarak azaldığı kanıtlanmıştır. Örneğin, kişi yaşlandıkça, antikorlar etkinliklerini kaybederler ve daha az sayıda yeni hastalık vücut tarafından etkili bir şekilde mücadele edilebilir, bu da hücresel strese ve sonunda ölüme neden olur [60]. Gerçekten de, düzensiz bağışıklık tepkisi kardiyovasküler hastalık, iltihaplanma, Alzheimer hastalığı (AD) ve kanserle ilişkilendirilmiştir. Tüm bu zararlı sonuçlar için doğrudan nedensel ilişkiler kurulmamış olsa da, bağışıklık sistemi en azından dolaylı olarak ilişkilendirilmiştir [61].

1.3.1.4 Metabolik Teori

Bu teori, yaşlanmanın metabolik süreçlerdeki birikimlerden kaynaklandığını öne sürer [62-64]. Serbest radikallerin birikimi sonucu oksidatif stresin artması ve hücre hasarına yol açması, mitokondriyal disfonksiyon, enerji üretimindeki azalma gibi metabolik faktörler senesensi hızlandırabilir [50].

1.3.1.5 Hormonal Teori

Bu teoriler, yaşlanmanın hormon düzeylerindeki değişikliklerle ilişkili olduğunu öne sürer. Yaşlanma sürecinde azalan hormon seviyeleri, hücrelerin ve dokuların işlevlerinde değişikliklere neden olabilir. Yaşlı insanlar, genç yetişkinlere kıyasla en önemli hormonların önemli ölçüde daha düşük seviyelerine ve üretimlerine sahiptir. Büyüme hormonu (GH) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) [65-67], melatonin [68-70], TSH [71], tiroid hormonları (özellikle en aktif olan triiyodotironin) [72-77], kalsitonin [78, 79] , DHEA (in) seviyeleri özellikle serumdaki sülfatlanmış form ve idrardaki 17-keto-metabolitleri) [80, 81], aldosteron [82], östrojenler [83, 84], erkeklerde ve kadınlarda testosteron [85], yetişkinlerde yaşla birlikte giderek azalır. İnsülin salgılanması bile yaşla birlikte, özellikle ihtiyaçlar daha yüksek olduğunda, örneğin glikoz alımına yanıt olarak zayıflar [86].

1.3.1.6 Epigenetik Değişimler

Bu teoriye göre, yaşlanma süreci epigenetik mekanizmalar tarafından etkilenir [87]. Epigenetik değişiklikler, DNA'daki gen ifadesini etkileyen kimyasal modifikasyonlardır [88]. Yaşlanma ile birlikte epigenetik değişiklikler meydana gelir ve bu da gen ifadesinde değişikliklere yol açarak yaşlanma sürecini etkiler [89]. Bu teoriler, yaşlanmanın genetik ve biyokimyasal düzeyde karmaşık bir süreç olduğunu göstermektedir. Araştırmalar bu teorileri destekleyen veya çürüten kanıtlar sunmaya devam etmektedir.

1.3.2 Hasarlı Yaşlanma Teorileri

Hasarlı yaşlanma teorileri, yaşlanmanın temel nedeninin vücuttaki hasar birikiminden kaynaklandığını öne süren teorilerdir. Bu teorilere göre, yaşlanmanın ana sebepleri, hücrelerin ve dokuların zaman içinde hasar görmesi ve bu hasarın birikmesidir. Hasarlı yaşlanma teorileri, yaşlanmanın moleküler ve hücresel düzeydeki hasar birikimiyle yakından ilişkili olduğunu vurgular. Bu teoriler, yaşlanmanın ilerlemesini yavaşlatmak veya tersine çevirmek için hücresel onarım ve yenilenme süreçlerine odaklanan anti-senesens stratejileri geliştirmeye yönelik araştırmaları desteklemektedir.

1.3.2.1 Serbest Radikal Teorisi

Yaşlanma mekanizmasını açıklayan birçok teori olmasına rağmen, serbest radikal teorisi, reaktif oksidanların hücrelerin bileşenleriyle nasıl etkileşime girerek uzun süreli birikmiş hasara ve yaşlanmaya yol açtığına dair birçok şeyi açıklamak için bir temel oluşturur [90]. 1954 yılında ortaya atılan bu teori, yaşlanmanın serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasar birikimi sonucunda meydana geldiğini ileri sürer. Teori 1972' de çoğu serbest radikal reaksiyonlarının (FRR) mitokondri tarafından yaşla birlikte artan bir oranda başlatıldığı ve yaşam süresinin mitokondriye verilen serbest radikal hasar oranı tarafından belirlendiği önerileriyle genişletilmiştir [91]. Serbest radikaller, normal metabolik süreçlerin bir yan ürünü olarak ortaya çıkan ve hücrelerde oksidatif stresin artmasına yol açabilen reaktif moleküllerdir. Oksidatif stres, hücrelerin lipitler, proteinler ve DNA gibi molekülleri hasarlayarak yaşlanma sürecini hızlandırır [92].

1.3.2.2 Glikasyon Teorisi

Bu teoriye göre, yaşlanmanın temel nedenlerinden biri, glikasyon adı verilen bir süreç sonucunda oluşan ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) birikimidir. Glikasyon, şeker moleküllerinin proteinlere bağlanmasıyla oluşan bir kimyasal reaksiyondur. AGE'ler, hücrelerin ve dokuların normal işlevlerini bozan ve yaşlanma belirtilerini tetikleyen birikimlere yol açar [93]. Bu süreç aynı zamanda diyabet ve ateroskleroz gibi metabolik hastalıkların patolojisine ve yaşlanmanın nörodejeneratif hastalıklarıyla ilişkili oksidatif stres ve enflamasyona da katkıda bulunabilir. Bu hipotez için destek, kahverengileşme (Maillard reaksiyonu), floresan, çapraz bağlanma, çözünmezlik ve kolajenlerde ve lens kristallerinde AGE'lerin birikiminde yaşa bağlı bir artışı içerir [94].

1.3.2.3 Protein Birikimi ve Proteostaz Bozuklukları

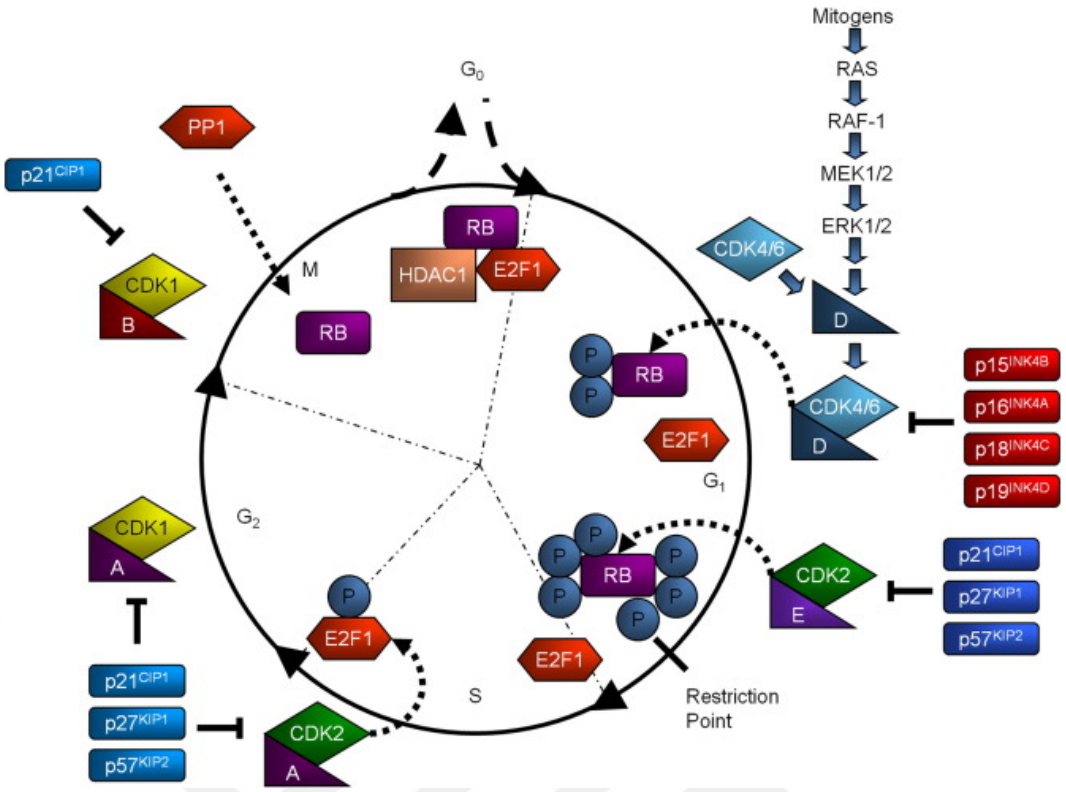
Proteinler çok sayıda biyolojik süreçte çok önemli bir rol oynar ve hücre işlevselliğinin sürdürülmesini sağlar. Bir protein fizyolojik koşullar altında sentezlendiğinde, genetik bilginin biyolojik aktiviteye nasıl dönüştürüleceğini tanımlayan belirli bir üç boyutlu yapıya katlanır. Moleküler şaperonlar, diğer proteinlerin doğru katlanmaya ulaşmasına yardımcı olmada ve agregasyonu önlemede çok önemli bir rol oynar [95]. Ancak çeşitli dış uyaranlar, proteinlerin doğal olandan farklı yapılar benimsemesine neden olarak müdahale edebilir. Bu

nedenle proteostazın sürdürülmesi, moleküler şaperonların, düzenleyicilerinin ve proteolitik bozunma mekanizmasının karmaşık etkileşimini içerir ve memeli hücrelerinde yaklaşık 2.900 farklı proteinden oluşan karmaşık bir şekilde koordine edilmiş Proteostaz Ağı (PN) oluşturur [96, 97]. Bu ağ genç ve sağlıklı organizmalarda dengeli olsa da, dış faktörler ve yaşlanma bu dengeyi bozarak protein çözünürlüğünün kaybolmasına ve yanlış katlanmış protein agregatlarının birikmesine yol açabilir [98, 99].

Bu teoriye göre, yaşlanma sürecinde hücrelerde protein birikimi meydana gelir. Özellikle yaşlılıkla birlikte, hücreler proteinleri düzgün bir şekilde katlanma ve yıkma yeteneklerini kaybeder. Bu durum proteostaz bozuklukları olarak adlandırılır ve hücrelerin normal işlevlerini etkiler. Hücrelerin işlevsel bir proteomu sürdürme yeteneğindeki yaşa bağlı düşüş, yaşa bağlı hücresel işlev bozukluğu ve dejeneratif hastalıkların başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir [100].

1.4 Hücre Döngüsü

Ökaryotik hücre döngüsü dört aşamaya ayrılır: G1, S, G2 ve M. G1, hücrelerin DNA replikasyonu sürecine hazırlandığı boşluk fazıdır. G1 evresinde hücre mitojenik ve büyüme inhibitörleri sinyallerini entegre eder ve hücre döngüsüne devam etme, duraklama veya döngüden çıkma kararını verir. Hem maya hem de memeli hücrelerinde G1'de önemli bir kontrol noktası tanımlanmıştır. Mayada başlangıç ve memeli hücrelerinde kısıtlama noktası olarak adlandırılan bu nokta, hücrenin DNA replikasyonuna ve hücre döngüsünü tamamlamaya kararlı hale geldiği noktadır [101]. DNA sentezi (S fazı). DNA sentezinin başlatılmasıyla işaretlenen G1/S sınırının aşılması, iki tam hücreye bölünme kararlılığını temsil eder [102]. İkinci boşluk (G2)' de hücre, M fazında gerçekleşen mitotik bölünmeye hazırlanır [103]. G2 fazı boyunca ilerlemeyi tamamladıktan sonra hücre, kromozomları iki ayrı yavru hücreye ayırarak mitoz halinde bölünür. Mitozun aşamaları; profaz, metafaz, anafaz ve telofazdır [104]. G0, hareketsiz (geçici veya kalıcı olarak döngü dışı) olan hücreleri ifade eder. Normal hücre, onu G0'dan G1'in erken kısmına taşımak için dış uyaranlara (mitojenler veya büyüme faktörleri) bağımlıdır. Hücre, sikline bağımlı kinazlar (CDK'ler) ile ilişkili siklinlerin ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek, bir dizi hücre içi fosforilasyon yoluyla iletilen bu dış uyaranlara yanıt verir [105].



Şekil 1.2 Hücre döngüsünün aşamaları. Düzenleyici CDK/siklin komplekslerinin aktivite bölgesi de belirtilmiştir [106].

1.5 Hücre Döngüsünün Kontrolü

1.5.1 Sikline Bağımlı Kinaz (CDK) Düzenlemesi

Moleküler düzeyde hücre döngüsü, protein komplekslerinin zamansal ve bölgesel olarak değişiklik gösteren aktiviteleri tarafından yönetilir. Her bir kompleksin merkezinde temel düzenleyici alt birim olan bir siklin ve katalitik alt birim olan siklin bağımlı kinaz (CDK) bulunur. CDK/siklin komplekslerinin aktivitesi; siklin alt biriminin indüksiyonu ve degradasyonu, CDK alt biriminin aktive ve inhibe edici fosforilasyonu, farklı hücresel kompartımanlar içinde bölgesel dağılımları ve CDK inhibitörlerinin (CKI'ler) CDK/siklin kompleksine bağlanması gibi karmaşık bir olaylar ağı tarafından düzenlenir [107]. Siklin bağımlı kinazlar, bir serin/treonin protein kinaz ailesi olarak aktivitelerini siklinler ile kompleks oluşturarak göstermektedir [108]. CDK'ler, hücre dışı ve hücre içi sinyallere yanıt olarak hücre döngüsü kontrol noktalarını ve transkripsiyonel olayları düzenleyerek hücre proliferasyonunda rol oynayan kilit düzenleyici enzimlerdir [109]. CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6 ve CDK7, hücre döngüsü geçişlerini ve hücre bölünmesini doğrudan düzenler [109]. Hücre döngüsünün fazlarının her biri, farklı bir siklin

tipinin ekspresyonu ile karakterize edilir ve siklin seviyelerindeki dalgalanmalar, CDK aktivitesinin düzenlendiği birincil mekanizmayı temsil eder. Hareketsiz hücreler, büyüme faktörlerinin eklenmesiyle uyarıldığında, ilk ifade edilecek siklinler olan D-tipi siklinler D1, D2 ve D3'tür [110]. G1'den S fazına geçiş, bu kontrol sisteminin kritik bir kontrol noktasıdır ve siklin D-CDK4/6–RB ekseni bu geçişin ana düzenleyicisidir [111]. D tipi siklin kinazların birincil substratı retinoblastoma tümör baskılayıcı proteindir (Rb). Rb içermeyen hücrelerde, hücre döngüsünün ilerlemesi için D tipi siklin kinaz aktivitesi gerekli değildir [112]. D-tipi siklinler, CDK4 ve CDK6 için düzenleyici alt birimler olarak işlev görmenin yanı sıra, doğrudan protein-protein etkileşimi yoluyla fosforilasyon için Rb ve cep proteinlerinin hedeflenmesine de yardımcı olur [113, 114]. Rb proteini, G1 ilerlemesinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar ve muhtemelen kısıtlama noktasını kontrol eden moleküler ağın önemli bir bileşenidir. [115]. Bölünen hücrelerde sikline bağımlı kinaz 2 (CDK2), G1/S ve S/G2 geçişlerini kontrol eden önemli bir hücre döngüsü bileşenidir [116]. E2F'nin aktivasyonu yoluyla siklin E, hücrelerin G1 boyunca ilerlemesi sırasında indüklenen bir sonraki siklindir [117, 118]. Siklin E, CDK2 ile birleşir ve bu kinaz kompleksi, hücrelerin G1'den S fazına geçiş yapması için önemlidir [119]. CDK2/siklin E kompleksleri, Rb'nin hiperfosforile edilmiş durumda tutulmasına katılır [120] ve dolayısıyla aktif E2F'nin birikmesi için pozitif bir geri besleme döngüsü düzenler. Daha sonra CDK2, siklin A ile kompleksleşerek S fazının ilerlemesinde önemli bir rol oynar.

Eskiden CDC2 olarak bilinen sikline bağımlı kinaz 1 (CDK1) -Siklin A bağlanması, G2 fazı sırasında hücre döngüsü ilerlemesini destekler. CDK-1 G2 fazından mitoza geçişi kolaylaştırmak için siklin B1 ile etkileşime girer [121]. Mitoz teşvik edici faktör (MPF) olarak da adlandırılan Siklin B-CDK1 kompleksi, mitotik giriş ve mitoz sırasında önemli bir rol oynar.

Sikline bağımlı kinaz 7 (CDK7), hücre döngüsü ilerlemesi ve gen transkripsiyonunun ana düzenleyicisidir [122, 123]. Sitoplazmada CDK7, CDK7'nin zorunlu bağlanma ortakları olan siklin H ve MAT1'i de içeren trimerik bir kompleks olan CDK-aktive edici kinazın (CAK) enzimatik çekirdeğini oluşturur. CAK, kilit hücre döngüsü CDK'larını (1, 2 ve 4) fosforile ederek tam aktivasyonlarını sağlar [124-127].

Tablo 1.1 Siklin-CDK kompleksleri hücre döngüsünün belirli noktalarında aktive edilir [128].

CDK	Diğer İsimlendirme	Siklin	Hücre Döngüsü Faz Aktivitesi
CDK4	-	Siklin D1, D2, D3	G1 faz
CDK6	-	Siklin D1, D2, D3	G1 faz
CDK2	-	Siklin E	G1/S faz geçişi
CDK2	-	Siklin A	S faz
CDK1	(cdc2)	Siklin A	G2/M faz geçişi
CDK1	(cdc2)	Siklin B	Mitoz
CDK7	-	Siklin H	CAK, tüm hücre döngüsü fazları

1.5.2 Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Çok sayıda kontrol noktası, ökaryotik hücre döngüsünün aşamaları (G0, G1, S, G2, M) boyunca doğru ilerlemeyi sağlar. DNA hasarına yanıt yolları, hücre döngüsünü geçici olarak durdurmak, DNA onarımını teşvik etmek veya kalıcı olarak senesens veya hücre ölümünü indüklemek için kontrol noktalarını aktive eder [129]. Hücre döngüsü kontrol noktalarındaki kusurlar gen mutasyonları, kromozom hasarı ve anöploidi ile sonuçlanabilir ve bunların hepsi tümör oluşumuna katkıda bulunabilir [130].

1.5.2.1 G1/S Kontrol Noktası

G1 fazı siklin/CDK komplekslerinin negatif düzenlenmesi G1/S kontrol noktası işlevinde önemli bir rol oynar. CDK'lar, CDK inhibitörleri adı verilen işlevsel olarak ilişkili bir grup protein tarafından negatif olarak düzenlenir [131]. Bu CDK inhibitörleri iki aileye ayrılır: INK4 inhibitörleri ve Cip/Kip inhibitörleri. Bilinen dört INK4 ailesi üyesi vardır: $p16^{INK4A}$, $P15^{INK4B}$, $p19^{INK4D}$ ve $p18^{INK4C}$ ve bilinen

üç Cip/Kip ailesi üyesi: $p21^{Waf1/Cip1}$, $p27^{Kip1}$ ve $p57^{Kip2}$ [132]. INK4 inhibitörleri, siklinlere bağlanmalarını önleyerek CDK4 ve CDK6'ya spesifik olarak bağlanan ve onları inaktive eden bir grup ankirin tekrarı içeren proteindir [133, 134]. Cip/Kip ailesi, hücre döngüsünün tüm aşamalarında CDK aktivitesini inhibe edebilir. Kip inhibitör ailesi, CDK-siklin komplekslerinin kinaz aktivitesine bağlanmak ve inhibe etmek için ortak bir N-terminal alanını paylaşır [135]. CDK inhibitörlerinin her iki ailesi de G1/S hücre döngüsü kontrol noktası sırasında düzenleyici rol oynar [132].

1.5.2.2 G2/M Kontrol Noktası

İkinci kontrol noktası, hatalı kopyalanmış ve hasar görmüş hücrelerin ortadan kaldırıldığı G2/M geçişidir. Bu kısıtlama noktası p53 tarafından düzenlenir ve DNA hasarına yanıt olarak etkinleştirilir. Aktif p53, p21, CDK1/Siklin B kompleksini inhibe ederek hücre döngüsünün ilerlemesini durdurur. p21 proteini, CDK1/Siklin B kompleksine bağlanarak bu kompleksin aktivitesini inhibe eder ve hücre döngüsünü G2 fazında duraklatır [104]. Hücre döngüsü durmasını ve hasar sonrası DNA onarımını indükleyen sinyalleşme olaylarındaki kilit oyuncular, fosfoinositol 3-kinaz benzeri kinaz ailesinin üyeleridir; yani mutasyona uğramış ataksi telanjiektazi (ATM) ve mutasyona uğramış ataksi telanjiektazi ve rad3 ile ilişkili (ATR). Bu kinazlar, DNA hasar yanıtı proteinlerini (örneğin, p53 ve Chk1/Chk2) aktive eder [136]. Cdc25C'nin DNA hasarına yanıt olarak inaktive edildiği mekanizma, Chk1 ve Chk2 tarafından fosforilasyonunu içerir bu da Cdc25C üzerinde 14-3-3 ailesinin proteinleri için bir bağlanma bölgesi oluşturur [137]. 14-3-3'e bağlanma CDC25C'yi sitoplazmada tutar ve CDC2'yi defosforile etme yeteneğini engeller. G2'nin tutuklanmasının başka bir mekanizması, daha önce açıklandığı gibi p38 MAPK/MK2'nin stres kaynaklı aktivasyonu ve ardından CDC25B/C'nin etkisizleştirilmesiyle sağlanır [138, 139]. G2 kontrol noktasını ortadan kaldırmaya yönelik başka bir strateji, DNA hasarıyla birlikte CDC25C fosfatazı aktive etmektir. Bu fosfatazın aktive edilmesi, siklin B/CDK1'in defosforilasyonu ve aktivasyonu ile sonuçlanır ve hücre döngüsünün M fazına ilerlemesine neden olur. G2 iptalinin alternatif bir yöntemi, siklin/CDK komplekslerini fosforile ederek ve etkisiz hale getirerek CDC25 aktivitesine karşı çıkan bir protein olan WEE1'in inhibisyonudur [140].

1.5.3 E2F Transkripsiyon Faktörleri Ailesi

E2F transkripsiyon faktörleri ailesinin, hücre döngüsünün progresyonu ve hücre proliferasyonu için gerekli genlerin zamanında ifade edilmesinde kilit bir rol oynadığı bilinmektedir [141]. E2F transkripsiyon faktörleri ilk olarak adenovirüs E2 promotörüne bağlanabilen ve viral genleri aktive edebilen bir faktör olarak keşfedilmiştir. Daha sonraki çalışmalarla, E2F'nin C-MYC ve DHFR gibi viral olmayan genlerin promotörlerine de bağlandığı gösterilmiş, böylelikle hücre döngüsünde önemli bir düzenleyici olabileceğine dair ilk ipuçları bulunmuştur [142]. Memelilerde, E2F ailesi dokuz farklı proteine öncülük eden sekiz genden (E2F1-8) oluşmaktadır [143]. E2F3 geninden alternatif promotorlar aracılığıyla E2F3a ve E2F3b olarak adlandırılan iki E2F3 proteini üretilmektedir [144]. İlk raportör gen tespitlerine ve hücre döngüsü sırasında ifade şekillerinin değerlendirilmesine göre, E2F'ler transkripsiyonel aktivatörler (E2F1-3) veya transkripsiyonel represörler (E2F4-8) olarak sınıflandırılmıştır [145].

1.5.4 Retinoblastoma Ailesi Üyeleri

Retinoblastoma ailesi üyeleri Rb/p105, Rb2/p130 ve p107, faaliyetleri hücre döngüsüyle bağlantılı olan transkripsiyonel düzenleyicilerdir [146]. Her üç RB ailesi üyesi de LXCXE motifi ile etkileşime giren 'cep' olarak adlandırılan korunmuş bir domain içermektedir [147]. Retinoblastoma geninin (RB) ürünü (pRb) hücre döngüsü sırasında S fazına girişi önler ve bu büyüme baskılayıcı işlevin etkisizleşmesinin geç G1 fazı sırasında pRb hiperfosforilasyonundan kaynaklandığı kabul görmektedir [148]. Retinoblastoma tümör baskılayıcı homologları E2F faktörlerinin aktivitesini inhibe ederek hücre döngüsü progresyonunu kontrol edebilmektedir [149]. Hipofosforile Rb'nin E2F'ye bağlanması, transaktivasyon aktivitesini aşağı doğru regüle eder ve belirli promotör dizilerinde Rb ve E2F, transkripsiyonu aktif olarak baskılayan bir kompleks oluşturabilir [150]. G1 siklinleri (D tipi siklinler ve siklin E), sikline bağımlı kinazlar (CDK4, 6 ve 2), CDK inhibitörleri ve protein fosfatazlar arasındaki etkileşim, cep proteinlerinin fosforilasyon durumunu belirlemekte ve bu da cep proteinlerinin E2F ile kompleks oluşturma kapasitesini düzenlemektedir. E2F aktivitesi ayrıca siklin A, Sp1, p53 ve ubikitin-proteazom yolağı gibi diğer faktörlerle doğrudan etkileşimler yoluyla düzenlenir [151]. Siklin bağımlı kinazlar daha aktif hale geldikçe RB, CDK'ye bağlı fosforilasyon ile inaktive edilir [152]. RB işlevinin kaybıyla sonuçlanan genetik

değişikliklerin, E2F aktivitesini serbest bırakarak ve hücre proliferasyonunu düzensizleştirerek kansere neden olduğu düşünülmektedir [153].

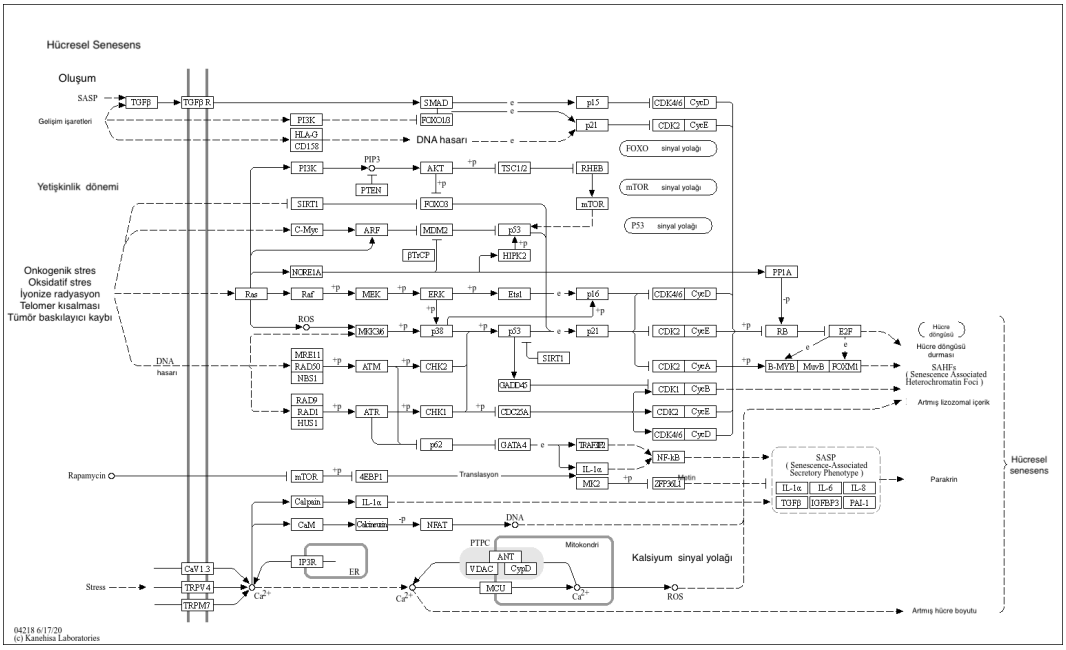
1.5.5 Anafazı Teşvik Edici Kompleks/Siklozom

Anafaz teşvik edici kompleks/siklozom (APC/C), metafazdan anafaza mitotik geçişi düzenlemedeki rolü nedeniyle hücresel bölünme için oldukça önemli olan, evrimsel olarak korunmuş bir protein kompleksidir [154]. APC/C, siklinlerin ve diğer hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin ubikitilasyonunu katalize ederek kardeş kromatid ayrımını ve mitozdan çıkışı kontrol eder [155]. APC'nin aktivitesi mitozun ortasında önemli ölçüde artar ve G1 fazının sonuna kadar aktif kalır. G1/S eşiğinde zorunlu inaktivasyonunu takiben, APC/C aktivitesi sonraki mitoza kadar düşük kalır [156]. Hücre döngüsünde yer alan bir diğer önemli protein kompleksi; SKP1, CUL1, F-box protein (SCF) kompleksidir [157]. SCF, mono-ubikitin veya poli-ubikitin zincirlerini protein hedeflerine kovalent olarak bağlayan bir E3 ubikitin ligazdır [158]. Bu iki E3 ubikitin ligaz ailesi (APC ve SCF) de, CDK düzenleyicilerinin çoğunun ubikitinasyonundan ve proteazomal degradasyonundan sorumludur [159]. SCF kompleksleri hücre döngüsü boyunca kullanılırken, APC temel olarak mitoz ve G1 fazı sırasında işlev görmektedir [160].

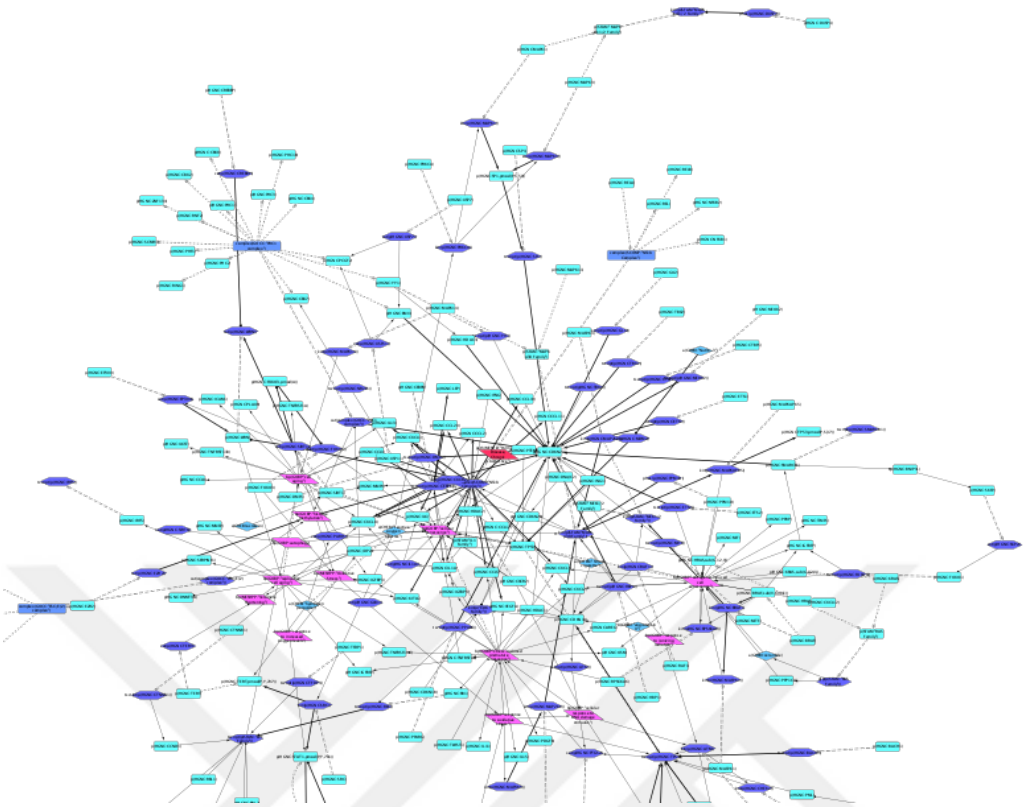
1.6 Hücresel Senesens

Hücresel senesens, çoğalma yeteneğine sahip hücrelerin bu yeteneklerini esasen geri döndürülemez bir şekilde kaybettikleri karmaşık bir stres yanıtıdır (Şekil 1.3) [161]. Hücresel senesens, çeşitli somatik hücrelerde meydana gelen çok yönlü bir süreçtir ve genetik, epigenetik ve çevresel faktörler tarafından düzenlenir. Hücresel senesens programı, hücre döngüsünün hem G1 hem de G2 fazında yer alır, sırasıyla G1/S ve G2/M ilerlemesini sınırlar ve uzun süreli hücre döngüsü durmasına neden olur. Yaşlanmanın ayırt edici özelliklerinden biri olan hücresel senesens, çeşitli mekanizmalarla doku veya organ işlev bozukluğuna ve çeşitli ARD patofizyolojisine katkıda bulunur [162, 163]. Daha spesifik olarak, yaşlanmış memeli organlarındaki tüm dokularda olmasa da birçok dokuda SC'ler birikir [164]. Bu birikim, oluşumları ve ortadan kaldırılmaları arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. Yaşlanan hücreler metabolik olarak aktiftir ve orijinal replikasyon yetkinliğine sahip hücrelerin işlevsel rollerini yerine getirebilirler.

Normal insan hücreleri kültürde sınırlı bir bölünme kapasitesine sahiptir [57]. Büyüme uyaranlarının varlığında bile esasen geri döndürülemez olan bu çoğalma yeteneği kaybı hücresel yaşlanma olarak adlandırılır. Hücresel yaşlanma çeşitli dokuların yaşlanması sırasında gözlemlenmiştir [165, 166]. Yaşlanan hücreler, osteoartrit ve kardiyovasküler hastalıklar gibi yaşla ilişkili çeşitli doku patolojileriyle bağlantılıdır (Şekil 1.4) [167].



Şekil 1.3 Hücresel senesens oluşumu ile ilişkili yolaklar (Kegg pathway database)



Şekil 1.4 Senesens ve ilişkili yolaklar (https://cytoscape.org/)

1.7 Senesens İlişkili Morfolojik Değişiklikler ve Markırlar

1.7.1 Morfolojik Özellikler

Senesens'e girmiş hücreler genişlemiş, düzleşmiş ve düzensiz bir morfoloji, daha büyük bir çekirdek, tek ve daha büyük bir nükleolus ve artan sayıda sitoplazmik vakuol gibi ayırt edici morfolojik özellikler sergiler [162]. Hücre morfolojisi, tübülin mikrotübüller, aktin mikrofilamentler ve ara filament proteinlerinden oluşan hücre iskeleti tarafından düzenlenir. Filamentöz aktin stres lifleri genellikle yaşlanmış hücrelerde belirgindir [168]. Aktin stres liflerinin uçları, hücre zarını geçerek hücre dışı matriks ile temas eden vinculin ve paxillin gibi proteinlerden oluşan odak yapışma plakalarına bağlanır. Bu proteinler senesens sırasında yeniden düzenlenir [169]. Ayrıca, Rac ve CDC42 gibi küçük GTPazlar, integrinler ve caveolin-1 gibi lipid raft proteinleri, senesens morfolojisinin düzenlenmesinde önemli roller oynayabilir; senesens fibroblastlarda caveolin-1'in yok edilmesi, küçük, iğ şeklinde bir morfolojiye yol açar [170]. Ayrıca, senesens sırasında tip III ara filament proteini vimentin'in yukarı yönde düzenlenmesi ve artmış

filamentasyonu meydana gelir ve proliferatif hücrelerde vimentin aşırı eksprese edildiğinde senesens morfoloji oluşur [171]. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, in vitro deney çalışmalarında gözlemlenen senesens hücrelerin genişlemiş fenotipinin in vivo çalışmalarda fizyolojik olarak anlamlı olabileceğini göstermiştir. Akış sitometrisi ve görüntü analizi sonuçlarına göre yaşlanmış farelerden alınan dokulardan ve tümörlerden elde edilen senesens hücrelerin sağlıklı hücrelerden daha büyük olduğu gözlemlenmiştir [172]. Yapılan çalışmalarda, senesens hücre sayısının yaşlanan ciltte önemli miktarda biriktiği bildirilmiştir [173, 174].

1.7.2 Senesens ile İlişkili Beta-Galaktozidaz (SA-β-gal)

Yaşlanmış hücreler için en yaygın kullanılan biyomarker, replikatif veya stres kaynaklı yaşlanmış hücrelerde pH 6.0'da tespit edilebilen, ancak proliferatif hücrelerde bulunmayan β-galaktozidaz aktivitesi olarak tanımlanan yaşlanma ile ilişkili β-galaktozidaz (SA-β-Gal) enzimidir [165]. Ancak, SA-β-gal'in kökeni ve yaşlanmadaki biyolojik rolü bilinmemektedir [175]. β-Gal enzimi, indol ve galaktozdan oluşan suda çözünebilen bir molekül olan 5-bromo-4-kloro-3-indol-b-d-galaktopiranozid (X-gal) ile pH 6.0'da reaksiyona girer. X-gal, β-gal tarafından hidrolize edildiğinde, hücrelerde veya dokularda görselleştirilebilen koyu mavi, çözünmeyen bir madde açığa çıkar [176]. β-galaktozidaz, pH 4.0'da tüm hücrelerde mevcut olup tespit edilebilir, ancak yalnızca yaşlanmış hücreler pH 6.0'da tespit edilebilir [176, 177]. Bununla birlikte, SA-β-gal bazı yaşlanmamış hücrelerde de tespit edilebilir; örneğin, yüksek hücre yoğunluğu olan uzun inkübasyonlarda, serum yoksunluğunda veya hidrojen peroksit varlığında. Buna rağmen, SA β-Gal hala en yaygın kullanılan hücresel yaşlanma göstergelerinden biridir. SA-β-gal-pozitif hücreler, farelerde yaşa bağlı kemik kaybı olan perigonadal adipöz dokuda tespit edilmiştir[178]. Yaşlı farelerin aortasında, genç farelerin aortasına kıyasla SA-β-gal-pozitif bölgenin önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir [179]. İdiopatik pulmoner fibrozis (IPF) hastalarından toplanan tip II alveolar epitel hücrelerinin (AEC) yüksek bir yüzdesinde SA-gal aktivitesi bulunmuştur [180]. Bu sonuçlar, SA-β-Gal'in yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıkların iyi bir göstergesi olduğunu göstermektedir.

1.7.3 Senesens ile İlişkili Heterokormatin Odakları (SAHF)

Kromatin, senesens ile birlikte dramatik bir şekilde değişir ve bu değişikliklerin önemli işlevsel sonuçları vardır. Histon modifikasyonları, örneğin asetilasyon ve metilasyon, iki farklı kromatin durumuna yol açar: yoğunlaşmış (erişilemez heterokromatin) ve yoğunlaşmamış (erişilebilir ökromatin) [181]. Heterokromatin Odakları (SAHF) ilk kez 2003 yılında Narita ve arkadaşları tarafından tanımlandı. Bu araştırmacılar, yaşlanmış hücrelerin çekirdeklerinde normal hücrelerdeki kromatinden kolayca ayırt edilebilen 30-50 parlak, noktamsı DNA boyalı yoğun odakların bulunduğunu gözlemlediler [182]. SAHF, nükleaz dirençli kromatin sıkışması ile oluşur [182] ve her bir odak, görünüşe göre bir kromozomun yoğunlaşmış kromatini temsil eder[183]. SAHF ayrıca, transkripsiyonel olarak sessiz heterokromatine özgü histon modifikasyonlarına da sahiptir, örneğin lizin 9-trimetil histon H3 (H3K9Me3) [182]. SAHF'nin oluşumu ve/veya korunmasına katkıda bulunan diğer bazı proteinler arasında histon şaperonları HIRA ve Asf1 [184], heterokromatin proteinleri 1 (HP1) [182] ve yüksek mobilite grubu A (HMGA) proteinleri [185], histon varyantı macroH2A [186] ve pRb [182] yer alır. p16-pRb yolu, SAHF oluşumu için gerekli görünmektedir [182, 184] ve işlevsel olarak SAHF'nin proliferasyonu teşvik eden genlerin transkripsiyonel susturulmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir [182].

1.7.4 Senesens İlişkili Fenotipler (SASP)

Yaşlanan hücre fenotipleri standart temel özelliklere sahiptir in vitro ve in vivo olarak benzersiz evrensel olmasına rağmen hücre yaşlanmasının ayırt edici özellikleri tam olarak anlaşılamamıştır. Yaşlanmış hücreler, topluca yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipi (SASP) veya Senescence-Messaging Secretome (SMS) olarak bilinen biyoaktif moleküller salgılar (Tablo 1.2) [187-189]. Farklı stres yanıtı yolları veya faktörler, SASP'nin gelişimini ve devamlılığını etkiler. Yaşlanan hücreler proliferasyon belirteçlerinin yokluğu ile karakterize edilirler. Bir çoğu, iki döngüye bağlı kinaz olan CDK4 ve CDK6'yı inhibe ederek hücre döngüsünün G1'den S fazlarına ilerlemesini önleyen tümör baskılayıcı p16'yı [190] ifade eder [191]. p16 da yaşla birlikte artar ve çok sayıda fare ve insan dokusunda güçlü bir yaşlanma belirtecidir [192, 193]. Deneysel veriler, yaşlanma ilişkili salgı fenotipinin (SASP) mikro ortam modülasyonuna katıldığını güçlü bir şekilde göstermektedir. SC'ler, ilgili hücre tipine ve stres etkenine göre farklılık gösteren

çok sayıda faktör salgılar. SASP, aralarında interlökin bulunan yüzlerce molekülün salgılanmasını içerir. (IL)-1 α/β, IL-6, IL-8, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)-β ve tümör nekroz faktörü (TNF)-a en iyi karakterize edilenlerdir [8]. Bu sitokinlerin/kemokinlerin bazıları, otokrin ve parakrin tarzda hareket ederek yaşlanma fenotipini indükleyebilir veya güçlendirebilir, senesensi bir "seyirci etkisi" yoluyla yayabilir [194]. SASP çoğunlukla bağışıklık sisteminin ana transkripsiyon faktörü olan NF-kB tarafından indüklenir. Yukarı akış, Janus kinaz (JAK), p38 ve diğer MAP kinazların tümü SASP kontrolünde rol oynar [195], Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) aracılı NOD benzeri reseptör ailesi pyrin alanı içeren (NLRP3) inflamatuarının aktivasyonu parakrin senesense aracılık eder [196].

Tablo 1.2 SASP faktörlerinin sınıflandırılması ve işlev listesi [197]

Sınıflandırma	**Adı/Fonksiyon**
Büyüme Faktörü	AREG / Bağışıklık hücre fonksiyonunu sürdürme
	VEGF / Anjiyogenezi düzenleme
	IGFBP-4 / Hızlandırılmış hücre yaşlanması
Kemokinler	CCL27 / Bağışıklık hücre fonksiyonunu azaltma
	GRO / Tümör oluşumunu teşvik etme
	IL-8 / Tümör hücresi invazyonunu artırma
Matriks Metalloproteinaz	MMP-3 / Hücre dışı matriksin parçalanması
	MMP-13 / Tümör anjiyogenezini düzenleme
	TIMP-1 / Hücre dışı matriksin parçalanmasını engelleme

Tablo 1.2 SASP faktörlerinin sınıflandırılması ve işlev listesi (Devamı)

İnterlökin	IL-1α / B lenfosit oluşumunu engelleme
	IL-1β / Enflamasyonu teşvik etme ve kök hücre yaşlanmasını indükleme
	IL-6 / Tümör hücresi invazyonu ile ilişkilendirilme
	IL-7 / B lenfosit üretimini düzenleme ve BMSC fonksiyonunu sürdürme
	IL-15 / Doğal öldürücü hücreleri aktive etme ve yaşlanmış hücreleri yok etme

1.7.5 DNA Hasarı Yanıtı

Genomik erozyonun temel sorunuyla başa çıkmak için, DNA hasarına yanıt (DDR) sistemlerinden oluşan sofistike bir ağ gelişmiştir. Bunlar bir dizi DNA onarım mekanizmasını, hasar tolerans süreçlerini ve hücre döngüsü kontrol noktası yollarını içerir. İşlevsel bir DDR'nin insan sağlığı için biyolojik önemi, DDR faktörlerindeki kalıtsal kusurların bağışıklık yetersizliği, nörolojik dejenerasyon, erken yaşlanma ve ciddi kanser yatkınlığı gibi çeşitli hastalıklarla sonuçlanan ciddi sonuçlarıyla açıkça gösterilmiştir [198]. p21, sadece G1 fazı siklinleri/CDK komplekslerini inaktive ederek değil, aynı zamanda muhtemelen DNA replikasyonunu inhibe etmek için Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA) ile doğrudan etkileşimi ve diğer hücre döngüsü düzenleyicileri ile etkileşimin aracılık ettiği dolaylı etkileri içeren diğer süreçler yoluyla da DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsünün durmasının ana aracısıdır. Buna ek olarak, p21'in birden fazla mekanizma aracılığıyla G2 fazının durdurulmasının sürdürülmesinde rol oynadığı gösterilmiştir [199]. DDR'nin erken dönemlerinde p53, sikline bağımlı kinaz inhibitörü 1A'yı (CDKN1A, $p21^{WAF1/CIP1}$ olarak da bilinir) transaktive ederek sikline bağımlı kinazların, CDK2 ve CDK4'ün inhibisyonuna yol açar ve böylece G1 hücre döngüsü durmasını tetikler G2/M kontrol noktasında, p53, stratifin (14-3-3σ), B-hücresi translokasyon geni 2 (BTG2), G2 ve S fazında ifade edilen protein 1 (GTSE1), büyüme durması ve DNA hasarına bağlı alfa (GADD45), hematopoetik

çinko parmak (HZF), poli(rC) bağlayıcı protein 4 (MCG10) ve reprimo (RPRM) dahil olmak üzere G2/M durmasının sürdürülmesi için hayati önem taşıyan hedef genleri düzenler [200].

1.7.6 Apoptoz ve Senesens

Her organ sisteminde fizyolojik denge, enerji bağımlı bir morfolojiye sahip olan ve apoptoz olarak bilinen bir tür programlı hücre ölümüne bağlıdır. Apoptoz, hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, protein parçalanması, DNA parçalanması ve fagositoz gibi farklı morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterize edilir [201]. Hücre döngüsü ve apoptoz arasında doğrudan bir bağlantı olduğu, mitoz ve apoptoz arasında bir dizi benzer morfolojik özellik bulunduğu gerçeğinden hareketle düşünülebilir. Apoptoz çok çeşitli sinyaller tarafından tetiklenebilir. Bunlar arasında Fas ligandı, tümör nekroz faktörü, büyüme faktörünün geri çekilmesi, viral veya bakteriyel enfeksiyon, onkogenler, ışınlama, seramid ve kemoterapötik ilaçlar yer alır. Bu sinyaller genellikle hücre tipine özgüdür. Bu ajanlar hücreden hücreye değişse bile, düzenlenmiş hücre ölümü sürecinin altında yatan temel biyokimyasal mekanizma vardır [202]. Apoptotik mekanizma iki ana yol tarafından düzenlenir: (I) ölüm reseptörü aracılı ekstrinsik yol ve (II) mitokondriyal aracılı intrinsik yol [203]. Ekstrinsik yol, Fas ve tümör nekroz faktörü reseptörlerinin diğer üyelerine bağlanan hücre dışı ligand, yani FasL tarafından tetiklenir ve kaspaz-8 ve son olarak efektör kaspaz-3/7 ve poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP) yoluyla kaspaz kaskad aktivasyonunu başlatan Fas-ilişkili ölüm alanının (FADD) uyarılmasına yol açar [204]. Kaspazlar, hücre sağkalımının ve çoklu düzenlenmiş hücre ölümü (apoptoz, piroptoz, nekroptoz ve otofaji ile ilişkili hücre ölümü) düzenlenmesi için kritik öneme sahip bir sistein proteaz ailesidir [205]. İntrinsik yolda, mitokondriyal membran potansiyelinin ($\Delta\Psi m$) değişmesi, sitokrom c gibi mitokondriyal iç membran proteininin salınımında bir artışa yol açabilir, bu da prokaspaz-9 ve apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) ile apoptozom oluşturur, bu da kaspaz-3/7'yi ve PARP'ın hızlı bölünmesini tetikler [206]. Senesense girmiş hücreler, normal hücrelere kıyasla apoptoza daha az duyarlı görünmektedir. Apoptoz direncinin, serumun uzaklaştırılması [207], UV maruziyeti [208], oksidatif stres [29] ve sitotoksik tedaviler [209] gibi çeşitli stres faktörlerine yanıt olarak arttığı gözlemlenmiştir. p53 hücre büyümesi, DNA hasarı onarımı ve apoptozun merkezi bir düzenleyicisidir [210]. Stres uyaranlarına yanıt

olarak, normalde düşük bir ifade seviyesine sahip olan p53, proteinin stabilitesindeki artış nedeniyle hücrelerde birikir. p53, DNA hasarı, hipoksi ve onkogen aktivasyonu gibi farklı uyaranlar sonucunda aktive olan çeşitli yolaklardan gelen sinyalleri entegre eder. Bu koşullar altında, p53 hücre döngüsünün durmasına, yaşlanmaya, farklılaşmaya, DNA onarımına, apoptoza ve anjiyogenezin engellenmesine yol açabilen çeşitli hücresel tepkileri başlatır [211]. Senesense girmiş hücreler, Bcl-2, Bcl-x1 ve Bcl-w gibi anti-apoptotik proteinleri yukarı regüle eder, bu da onları ölüm süreçlerine karşı dirençli hale getirir [208]. BCL-2 ailesinin farklı üyeleri, apoptozda çok önemli bir adım olan mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunu (MOMP) kontrol ettikleri için apoptozun başlıca düzenleyicileridir. Pro-apoptotik proteinler BAX ve BAK mitokondriyal dış membranda porlar oluşturarak sitotoksik moleküllerin sitozole salınmasına ve aşağı yönde kaspaz aktivasyonuna yol açarken, BCL-2 ve ilgili anti-apoptotik proteinler BAX veya BAK'ın oligomerizasyonunu antagonize ederek MOMP'yi önler [212]. NF-κB transkripsiyon faktörü çeşitli hayatta kalma faktörlerini yukarı doğru düzenler, aynı zamanda anti-apoptotik aktivitelerle de ilişkilendirilmiştir. NF-κB, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri olan Bcl-2, Bcl-Xl ve Bfl-1/A1'in ifadesini yukarı doğru düzenler [213]. Fosfatidilinositol 3′-kinaz (PI3-K)/Akt sinyal yolu, hücre içindeki kilit pro-survival yollardan biri olarak kabul edilir. Birçok hücresel uyaran türü tarafından aynı zamanda toksik etmenler tarafından aktive edilir ve çoğalma, büyüme, transkripsiyon, translasyon, hücre döngüsü ve ayrıca apoptoz gibi temel hücresel işlevleri düzenler [214]. Ayrıca, FOXO4 yaşlanmış hücrelerde aşırı eksprese edilir ve bu hücrelerin apoptoza karşı direnç göstermesine neden olur. FOXO4 sinyalizasyonunun engellenmesi, senesense girmiş hücrelerin apoptoz yoluyla yok edilmesine yol açar [215].

1.8 Hücresel Senesens İlişkili Hastalıklar

1.8.1 Diyabet ve Dislipidemi

Senesense bağlı diğer hastalıklarda olduğu gibi, hücresel senesens (SC) gelişimi ve birikimi diyabet ve obezitenin altında yatan sebeplerdir. SC diyabet ve obezite ile ilişkili doku disfonksiyonu ve komorbiditede rol oynar. Pankreatik β-hücre fonksiyonunu, SASP aracılı doku hasarını doğrudan etkileyerek ve adipoz doku

fonksiyonunu kolaylaştırarak tip 1 ve 2 diyabet patogenezine olumsuz katkıda bulunabilirler [216].

1.8.2 Kardiyovasküler Hastalıklar

Senesens ilişkili fenotipler endotel ve vasküler düz kaslarda aterosklerotik plak oluşumunun kritik etkenleridir. Roos ve arkadaşları [217]. Hücresel senesens'in geri döndürülmesi, yaşlanan hayvanlarda vazomotor disfonksiyonun iyileşmesine ve kalsifiye plak oluşumunun azalmasına yol açtığını bildirerek, ateroskleroz gelişiminde patolojik bir olay olan endotelyal disfonksiyonda SC 'nin önemini göstermiştir [162].

1.8.3 Kanser

Kontrolsüz proliferasyon ve metastaz kanserin karakteristik özellikleridir. Diğer senesens ilişkili hastalıklar gibi, hücresel senesens ve senesens de kanser gelişiminde önemli rol oynar [218]. SC'nin, senesens ilişkili hücre döngüsü durmasının önceden belirlenmiş tümör baskılayıcı rollerinin aksine, hem hücre hem de hücre dışı otonom mekanizmalarla tümör oluşumunu teşvik ettiği gösterilmiştir. Senesense neden olan kanser tedavilerinin senolitiklerle birleştirilmesine yönelik farmakolojik yaklaşım, yaşlanan kanser hücrelerinin köklenme riskini, kanser büyümesini ve kanser tedavisinin yan etkilerini azaltmak için uygun bir seçenek olacaktır [219].

1.8.4 Böbrek Hastalıkları

Senesens ve SC fazlalılığı, glomerüloskleroz ve nefropatiler gibi renal komplikasyonlarla ilişkilendirilmiştir [163]. Çeşitli böbrek kompartmanlarında biriken senesense girmiş hücre içeriğinin farmakolojik olarak temizlenmesi böbrek yaşlanmasını ve koşullarını iyileştirecektir.

1.8.5 Karaciğer Hastalıkları

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), hepatik inflamasyon, steatoz, siroz, sarılık, hepatik ensefalopati, portal hipertansiyon ve hepatoselüler karsinom (HCC) gibi kronik karaciğer hastalıklarının başlangıcı, hücresel senesens yakından bağlantılı ortak yaşlılık hastalıklarıdır [220]. Bir senolitik kullanılarak senesense girmiş hücrelerin ortadan kaldırılması, yaşlanan farelerin karaciğerindeki hepatik steatozu ve portal inflamasyonu, nekrozu ve fibrozu hafifletmiştir [221].

1.8.6 Osteoartrit

Osteoartrit (OA), hareketli eklemleri içeren kronik dejeneratif bir hastalıktır ve yaşlı insanlar arasında kronik ağrı ve sakatlığın önde gelen nedenidir. Travmatik yaralanmalar sırasında yaşlanma ve doku rejenerasyonu, kıkırdak dokularında SC'nin birikimini teşvik eder [222, 223]. Antiapoptotik proteinlerin ve senomorfiklerin farmakolojik olarak hedeflenmesi, SASP salgılanmasını ve sıçanlarda posttravmatik OA gelişimini hafifletir [224].

1.8.7 Akciğer Hastalıkları

Radyografik olarak belirgin interstisyel yeniden şekillenme ile karakterize edilen idiyopatik pulmoner fibroz (İPF), anormal şekilde aktive olmuş alveolar epitel hücrelerinin neden olduğu ölümcül, kronik, ilerleyici ve fibrotik yaşa bağlı bir akciğer hastalığıdır [225]. SASP yoluyla hücresel senesens, İPF'de fonksiyonel akciğer bozulmasını teşvik etmiştir. Bu nedenle, senoterapötiklerle hücre senesens'in farmakolojik olarak hedeflenmesi fibrotik akciğer hastalığını hafifletecektir.

1.8.8 Nörolojik Hastalıklar

Senesens, özellikle Alzheimer ve Parkinson hastalığı olmak üzere nörolojik bozukluklara yatkınlık yaratır. Hücresel senesens ile yaşlanma ve yaşa bağlı nörodejenerasyon arasında yakın bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Hücresel senesens birçok nörodejeneratif hastalıkta önemli bir rol oynamaktadır. Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında beyinde meydana gelen patolojik değişiklikler, hücresel senesens fenotipleri ile benzer özellikler gösterir [226]. Senoterapötikler ile farmakolojik müdahale bu nörolojik bozuklukları iyileştirmiştir.

1.9 Hücresel Senesens Hedefleme Terapötik Stratejiler

1.9.1 Senomorfik Ajanlar

Senesens karşıtı terapiye ilişkin temel ve klinik araştırmalar son yıllarda ilerleme kaydetmiştir. Her ne kadar senesense giren hücreleri seçici olarak öldüren ilaçlar ("senolitikler" olarak bilinir) çekici bir uygulama olsa da senesens karşıtı tedavide önemli bir rol oynayan SASP'yi hedef alan düzenleyici tedaviler, senesens ilişkili hastalıkları hedef alan terapötik stratejiler için bir başka önemli seçenek olarak ortaya çıkmaktadır [227].

1.9.2 Senolitik Ajanlar

Senesense girmiş hücreleri terapötik olarak hedef alma olasılığına yönelik ilgi giderek artmaktadır. Senesense girmiş hücrelerin temizlenmesine ya da proinflamatuar etkilerinin önlenmesine odaklanan birkaç umut verici yaklaşım geliştirilmektedir. Mevcut çabalar büyük ölçüde senesense girmiş hücrelerde hücre ölümünü indükleyebilen farmakolojik ajanların keşfine harcanmaktadır. Bu bileşikler genellikle "senolitik ilaçlar" veya "senolitikler" olarak adlandırılır. Apoptoz ve oksidatif strese direnç, SC'lerin ayırt edici bir özelliğidir [228] ve dirence aracılık eden moleküllerin tanımlanabileceği varsayılarak, SC'leri seçici olarak öldüren senolitik ajanlar geliştirmek için kullanılabilir. Bcl-2 protein ailesinin anti-apoptotik üyeleri: Bcl-2, Bcl-w, Bcl-XL ve Mcl-1, senesense girmiş hücre canlılığını sürdürmede yerleşik rollere sahiptir ve bu nedenle umut verici senolitik hedeflerdir [229]. Senolitiklerin etkilerini göstermeleri için sürekli olarak mevcut olmaları gerekmez. Senesens yanlısı yolakların kısa süreli bozulması yaşlanan hücreleri öldürmek için yeterlidir. Bu nedenle, senolitikler aralıklı olarak uygulandığında etkili olabilir [230].

1.10 Piron Yapısına Sahip Organik Asitler

Doğal ürünler, eski zamanlardan beri hastalıkların veya diğer patolojik durumların kimyasal tedavilerinin gelişimini etkilemiştir ve halen yeni farmasötiklerin icadının arkasındaki ana itici güçlerden biridir. Modern ilaç keşfi için önemleri, doğanın moleküler yapılarında kodladığı doğal biyolojik ilgilerinden kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak, sistematik olarak incelenmeleri kimya, farmakoloji, biyoloji ve hatta tıp gibi çeşitli disiplinlerde bilimsel ilerlemeyi teşvik etmiştir. Şelidonik asit, kojik asit, triasetik asit lakton ve sitrinin gibi piron yapısına sahip organik asitler, onları çeşitli alanlarda önemli kılan benzersiz kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir. Biyolojik sistemlerle etkileşime girme yetenekleri ve reaktiviteleri onları hem endüstriyel uygulamalar hem de bilimsel araştırmalar için değerli kılmaktadır [231].

Pironlar ve piranonlar hem bir oksijen atomu hem de bir ketonun karbonil grubunu içeren doymamış altı üyeli bir halka içeren yaygın heterosiklik bileşiklerdir. 2-piron ve 4-piron olarak adlandırılan iki izomerik formda bulunurlar. 2-piron (α-piron), doğal üründe bir iskele olan kumarin halka sisteminin bir parçası olarak bulunur. 4-

Piron (γ-piron) ayrıca kromon, maltol ve kojik asit gibi doğal olarak oluşan birkaç molekülde de bulunur [232]. γ-Piron bazlı doğal ürünler biyolojik olarak aktif bileşiklerin büyük bir sınıfını oluşturur ve yaşamın her üç aleminde de bulunur. Yapısal olarak oldukça basit olan γ-piron haşhaş asidinin 1805 yılında F.W. Sertürner tarafından Papaver somniferum'dan ilk kez izole edilmesinden bu yana,11 çok sayıda ilave γ-piron doğal ürünü izole edilmiştir. Bunların çoğu, allomon veya savunma bileşikleri olarak önemli bir rol oynadıkları görülen deniz organizmalarından elde edilmiştir [233]. γ-piron türevlerinin birçok antibakteriyel, antitümör ve antikanser özelliğe sahip olduğu bilinmektedir [234].

1.11 Şelidonik Asit

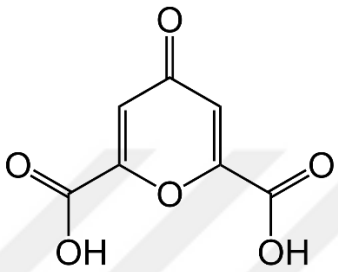
Şelidonik Asit (CA), Chelidonium majus (Celandine) (Şekil 1.5), Sorghum vulgare gibi birçok bitkide bulunan bir γ-piron bileşiğidir [235, 236]. CA, antimikrobiyal, antienflamatuar, onkostatik, analjezik ve sedatif etki gibi çok sayıda farmakolojik aktiviteye sahiptir [237, 238].



Şekil 1.5 Chelidonium majus L. bitkisi
(http://yabanicicekler.com/flower/chelidonium-majus-528)

Yapılan bir çalışmada, Şelidonik asidin, NF-κB'yi bloke ederek IL-6 üretimini ve IL-6 mRNA'nın ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir [239]. Bu moleküle olan ilgi, glutamat dekarboksilazın (GAD) güçlü bir inhibitörü olduğu ve enzimin çinko bölgesinin etki alanı olduğu bildirilen bir çalışma ile artmıştır [238]. Yapısal olarak, enzimin bu çinko bölgesi, histamin salımı ve enflamasyon olgusu ile ilgili birçok

immünolojik bölgeye benzer. Ayrıca çinko şelatlama özellikleriyle ilgili birkaç rapor vardır. Bir çalışma, Şelidonik asidin, histamin salınımını inhibe etmede, astım ve ilgili alerjik bozuklukların profilaksisinde kullanılan bir mast hücre stabilizörü olan disodyum kromoglikat kadar etkili olduğunu göstermiştir [235, 238, 240, 241]. Glutamat dekarboksilazların çok güçlü bir inhibitörü olması sebebiyle biyolojik olarak aktif olma kriterimize uyar [242]. Her iki karboksil grubu için yaklaşık 2,4 olan pKa değeri, Şelidonik asit'i fizyolojik pH'da etkili bir koordinasyon ajanı haline getirir [243].



Şekil 1.6 Şelidonik asit kimyasal yapısı
(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chelidonic-acid)

1.12 Senesens Deney Modelleri

1.12.1 In Vitro Senesens Deney Modelleri

Hücre kültürü, ökaryotik veya prokaryotik hücrelerin fizyolojik koşullarda büyümesini sağlayan laboratuvar yöntemlerini ifade eder. Kültürlenmiş hücrelerin deneysel uygulamaları, in vitro büyütülebilen hücre tipleri kadar çeşitlidir. Ancak klinik bağlamda hücre kültürü en yaygın olarak temel hücre biyolojisini inceleyen, hastalık mekanizmalarını kopyalayan veya yeni ilaç bileşiklerinin toksisitesini araştıran model sistemlerin oluşturulmasıyla bağlantılıdır. Bu uygulamalar için hücre kültürünü kullanmanın avantajlarından biri, genleri ve moleküler yolları manipüle etme fizibilitesidir. Ayrıca, klonal hücre popülasyonlarının veya spesifik hücre tiplerinin ve iyi tanımlanmış kültür sistemlerinin homojenliği, müdahale eden genetik veya çevresel değişkenleri ortadan kaldırır ve bu nedenle, tüm organ sistemlerini incelerken garanti edilemeyen yüksek tekrarlanabilirlik ve tutarlılığa sahip veri üretimine olanak tanır [244].

Hayvan modellerinin kullanımının etik sorunlar içermesi ve oldukça pahalı olması nedeniyle hücre kültürü in vitro modellerin kullanımı artmıştır. Hücre kültürü modelleri hem gıda hem de farmasötik alanlarda biyoyararlanım ve toksikolojik

çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsan kökenli hücreleri kullanan geliştirilmiş in vitro modeller, hayvan deneylerini azaltma avantajına sahiptir ve moleküler mekanizmaların basit ve tekrarlanabilir bir şekilde incelenmesine olanak sağlayabilir [245].

Senesens deney modellerinde, büyüme durana kadar (replikatif yaşlanma) sürekli kültür tarafından üretilen yaşlanan fibroblastlar, yaşlanma ve yaşla ilişkili hastalıkları incelemek için iyi bir model sağlar, yaşlanmanın yerleşik işaretlerinin çoğunu sergiler ve yaşlanan hücreleri çıkarmak için tasarlanmış müdahaleleri değerlendirmek için kullanılmıştır. Yaşlı hücrelerin kültürleri, proliferatif, yaşlanan, büyümenin durdurulduğu ve apoptotik hücre popülasyonlarından oluşan heterojen bir popülasyondur. Yaşlı insanlardaki doku ve organlar da aynı şekilde yaşlanan, çoğalan ve büyümeyi durduran hücre popülasyonlarının karmaşık bir karışımıdır [246]. Hücresel ortamın önemli bir yönü, çoklu hücre hatlarında büyümeyi, yapışmayı, farklılaşmayı, morfolojiyi ve hücre sinyallemesini etkilediği gösterilen hücre dışı bir matrisin (ECM) varlığıdır [247]. İki boyutlu hücre kültürü bir süredir kullanılmaktadır, ancak hücreleri plastik yüzeyler üzerinde düz katmanlar halinde büyütmek in vivo durumu doğru bir şekilde modellememektedir. İki boyutlu durumla karşılaştırıldığında, üç boyutlu (3D) hücre kültürü, yapay bir ortam sayesinde biyolojik hücrelerin üç boyutta da büyümesine veya çevreleriyle etkileşime girmesine olanak tanır. Çalışmalar, çok hücreli sferoid 3D modellerde gen ekspresyon profillerinin yanı sıra tedavi yanıtlarının in vivo duruma daha benzer olduğunu göstermiştir [248, 249].

1.12.1.1 In Vitro Senesens Çalışmak İçin Kullanılan Hücre Hatları

Şu anda, senolitik taramalarda kullanılan en yaygın hücreler, fetal akciğer fibroblast hücre suşları WI-38 ve IMR-90'dır. Bu hücreler satın alınabilirlik, kültürleme kolaylığı, tutarlı genetik arka plan, hastalık durumu olmaması ve sınırlı bir yaşam süresi gibi avantajlar sunarak replikatif yaşlanmanın seri geçişle indüklenmesine olanak tanır [250]. Fetal dokulardan elde edilen normal insan diploid fibbroblastları (HDF'ler) doku kültüründe 50±60 kez çoğalabilir, böylece oksidanlar tarafından üretilen hücresel ve moleküler değişiklikleri tanımlamak için kararlı bir sistem sağlar. Çoğalma ömürlerinin sonunda, HDF'ler kararlı bir senesens durumuna ulaşır. Senesens hücreler geri dönüşümsüz olarak büyümeyi durdururlar ve yüksek seviyelerde p21 ve p16 siklin bağımlı kinaz inhibitörleri içerirler [251]. İnsan

hücresel yaşlanmasını incelemek için kültürlenmiş fibroblastların kullanımına ilişkin en sık alıntı yapılan gerekçelerden biri, in vitro hücre popülasyonu replikasyonlarının kümülatif sayısında rapor edilen düşüş ve hücre kültürü donörünün artan yaşıyla birlikte hücre kültürü yaşlanmasının daha erken başlamasıdır [252].

1.12.2 In Vivo Senesens Deney Modelleri

In vivo çalışmalar in vitro bulguları doğrulayabilir ve hücre kültürleri üzerinde yapılan deneyler ile klinik çalışmalar arasında önemli bir ara adımı temsil eder. Hayvan modelleri, genellikle in vitro bulguları takip etmek ve değerlendirmek için kullanılır. Buna ek olarak, in vivo deneylerin sonuçları, yaşlanma indüksiyon mekanizmaları hakkında başka türlü erişilemeyen bilgiler sağlayabilir ve olası terapötik hedeflerin belirlenmesini kolaylaştırabilir. Daha da önemlisi, hayvan modelleri bozulmamış organizmalara dayanır ve bu nedenle bireysel dokuların ve moleküler yolakların birbirleri üzerindeki tüm etkilerini içerir. Hipokampus, hipokampal dentat girusta meydana gelen nörogenez ile yakından ilişkili olan uzamsal öğrenme ve hafızada önemli bir rol oynar. Ayrıca hipokampus, beyinde yaşa bağlı değişim açısından en hassas bölgelerden biridir. Beyin yaşlanması, belirli nöronal popülasyonların ve bağlantıların ilerleyici kaybı, davranışsal eksiklikler, artan oksidatif stres ve nörogenezde azalma gibi çeşitli fenotipler gösterir [253]. Deneysel yaşlanma modelleri arasında, uzun süreli D-galaktoz (D-Gal) maruziyeti doğal yaşlanmaya en çok benzeyendir. Bu fenomen galaktozemi durumu ile ilgili değildir. Aslında, D-Gal, anormal derecede artan seviyeleri galaktoz oksidaz enzimi tarafından D-galakto-ekzodialdoz ve hidroperoksite dönüştürülebilen ve böylece reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve oksidatif stresin oluşmasına neden olan indirgeyici bir şekerdir. Alternatif olarak, D-Gal serbest amino asit grupları ile enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları başlatarak ileri glikasyon son ürünleri (AGE'ler) oluşturabilir [254]. Yaşlanma sırasında ROS sentezi ve antioksidan aktiviteler arasındaki dengesizlik, beyinde Bax-, Bcl-2- ve kaspaz-3'e bağlı mekanizmalar yoluyla mitokondriyal apoptotik yolları tetikler ve sonuçta nöronal ölüme yol açar [255]. Beyin ve karaciğer fonksiyon bozukluğu yaşlanma ile yakından ilişkilidir ve oksidatif hasarın neden olduğu D-gal'e karşı hassastır [256]. Ayrıca, düşük dozda D-galaktoz enjeksiyonu farelerde hızlandırılmış yaşlanmaya benzeyen bazı değişikliklere neden olabildiği bildirilmiştir [257].

Bu çalışmanın temel amacı, Şelidonik asidin (CA) oksidatif strese bağlı hücresel senesensi hafifletme ve tersine çevirme potansiyelini araştırmaktır. CA'yı araştırmamızın odak noktası olarak seçmemizin nedeni, geniş farmakolojik aktivitelere sahip bir γ-piron bileşiği olması ve hücresel yaşlanma belirteçlerini hafifletebilen veya tersine çevirebilen hem senomorfik hem de senolitik bir ajan olarak potansiyele sahip olmasıdır. CA'nın SA-βgal aktivitesi, malondialdehit (MDA) gibi oksidatif stres göstergeleri ve yaşlanma sinyal yollarında rol oynayan gen-proteinler üzerindeki etkilerini gen ekspresyon analizi ve moleküler incelemeler yoluyla değerlendiren araştırmamız, CA'nın yaşa bağlı fizyolojik değişikliklerin modüle edilmesinde ve birçok yaşa bağlı hastalığın patogenezini etkilemede oynayabileceği kritik rolü vurgulamaktadır. Bu bulgular, oksidatif strese bağlı hücresel yaşlanmaya karşı in vivo araştırmalar için bir temel oluşturmaktadır. Ayrıca, bu bulgular hem tıbbi hem de kozmetik endüstrileri için tedavi geliştirme potansiyeli açısından önemli sonuçlar doğurmaktadır.

2
MATERYAL-METOD

2.1 In Vitro Materyal-Metod

2.1.1 Materyal

Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal, sarf malzeme ve cihazlar aşağıdaki tablolarda verilmiştir (Tablo 2.1, 2.2 ve 2.3).

Tablo 2.1 Kullanılan kimyasal listesi

Ürün	**Ürün Kodu**	**Firma**
Agilent RNA 6000 Nanochip kits	5067-1511	Agilent Technologies
Akridin-orange boya	GT9731	Glentham Life Sciences
Anti-p16 polyclonal antibody	10883-1-AP	Proteintech
Anti-p21 polyclonal antibody	10355-1-AP	Proteintech
Anti-pRB1 monoclonal antibody	67521-1-16	Proteintech
Anti- β-Actin Rabbit mAb	AC026	ABclonal
HRP-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H + L)	AS014	ABclonal
HRP-conjugated Goat anti- Mouse IgG (H + L)	AS071	ABclonal
Bakır klorür	751944	Sigma–Aldrich
BCA Protein Assay Kit	21071	Intron biotechnology
Bolt 4–12% Bis-Tris Plus jel	NW04122BOX	Thermo Fisher Scientific

Tablo 2.1 Kullanılan kimyasal listesi (Devamı)

Bovine serum albumin	A2153	Sigma–Aldrich
cDNA sentez kiti	4368814	Thermo Fisher Scienific
Comet Assay kit	ab238544	Abcam
4′,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) boya	62248	Thermo Fisher Scienific
DMEM Besiyeri	11885084	Gibco
DMEM Besiyeri	319-066CL	Wisent
DMSO	S-002-M	Sigma-Aldrich
Etilendiamintetraasetik asit	E5134	Sigma–Aldrich
Fetal sığır serum (FBS)	10500064	Gibco
Fosfat tamponu çözeltisi pH 7.4	10010015	Gibco
GSH-Px aktivite kiti	E-BC-K096-S	Elabscience
Hidrojen Peroksit Test Kiti	ab102500	Abcam
iBind Flex Solution	SLF2020	Thermo Fisher Scienific
Ksantin	X0626	Sigma–Aldrich
Ksantin oksidaz	X1875-5UN	Sigma–Aldrich
Lizis tamponu	78420	Thermo Fisher Scienific
Mitokondriyal Tetrazolyum (MTT) boyası	T0793	Bio Basic
MEM esansiyel olmayan amino asit solüsyonu	11140050	Gibco
Nitro blue tetrazolium chloride	ab146262 -NBT	Abcam
Parafolmaldehit fiksaitf solüsyon	J61984.AP	Thermo Fisher Scienific
Perklorik asit	244252-100ML	Sigma–Aldrich
%1 Penisilin-streptomisin-10.000 U/mL	15140122	Gibco

Tablo 2.1 Kullanılan kimyasal listesi (Devamı)

Pierce ECL western blotting substrate solüsyon	32106	Thermo Fisher Scienific
PMSF protease inhibitör	36978	Thermo Fisher Scienific
PowerUp™ SYBR™ green master mix	A25780	Thermo Fisher Scienific
PureLink™ RNA mini kit	12183025	Thermo Fisher Scienific
Qubit™ protein assay kit	Q33211	Invitrogen
RIPA lysis buffer	RIPA-100	Ecotech
Senesens β-Galaktosidaz boyama kit	ab102534	Abcam
Sodyum karbonat	223530	Sigma–Aldrich
Thiobarbiturik asit	T5500	Sigma-Aldrich
Trikloroasetik asit	100807	Merck
Tripan mavisi	15250061	Gibco
Tripsin-EDTA solüsyonu	25200056	Gibco

Tablo 2.2 Kullanılan sarf malzeme listesi

Sarf malzeme	**Marka**
Hücre büyütme flaskları (T25, T75)	NEST
Thoma Lamı	Marienfeld
Steril Pipet ucu(1000 µl-200 µl-10 µl)	NEST
96 kuyulu mikroplaka	NEST
96 kuyulu PCR mikroplaka	Thermo Fisher Scienific
24 kuyulu plaka	NEST
12 kuyulu plaka	NEST

Tablo 2.2 Kullanılan sarf malzeme listesi (Devamı)

6 kuyulu plaka	NEST
Kryo tüp	NEST 607001
50 ml steril santrifüj tüp	NEST 601002
15 ml steril santrifüj tüp	NEST 601002
2 ml steril tüp	NEST
Steril tek kullanımlık serolojik pipet (1 ml, 2 ml, 5 ml,10 ml hacim)	CAPS
0,2 mikrolitrelik PCR tüpü	Thermo Fisher Scienific
Cell Scraper	NEST
Parafilm	ISOLAB

Tablo 2.3 Kullanılan cihaz listesi

Cihaz	**Marka-Model**
Agilent bioanalyzer 2100 system	Agilent Technologies
iBind Flex Western System	Thermo Fisher Scientific
iBlot 2 Dry Blotting System	Thermo Fisher Scientific
Manyetik Karıştırıcı	Variomag Mono
Mini Santrifüj Cihazı	Hermle Z 206 A
Hassas Terazi	Shimadzu
Otoklav	Hirayama
Santrifüj Cihazı	Beckmann Coulter Allegra X-30 R
UV-Vis Spektrofotometre	Shimadzu UV-1800
Nanodrop	Thermo Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers

Tablo 2.3 Kullanılan cihaz listesi (Devamı)

Elektrikli pipet pompası	ISOLAB
Ultrasonik su banyosu	Bandelin Sonoplus
Floresans Faz-Invert Mikroskop	Zeiss Axio Vert
Saf Su Cihazı	Sartorious Wall Mounted Arium Pro Ultrapure Water System
CO_2 İnkübatör	Biosan, ES 20
Biyogüvenlik Kabini	Hedlab XPROII
Real Time PCR cihazı	StepOnePlus Thermo Fisher Scientific
pH metre	Hanna
Etüv	Memmert
Görüntüleme cihazı	GenBox BOX imagER Fx
UV plate okuyucu	BioTek PowerWave XS2
Western Transfer Sistemi	Trans-Blot Turbo Transfer System
Vorteks	Velp Scientifica
Yatay elektroforez	Cleaver scientific Nanopac-300P&500 Power supply set
-80 ^{0}C Dondurucu	Thermo Fisher Scientific Forma 700 series

2.1.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

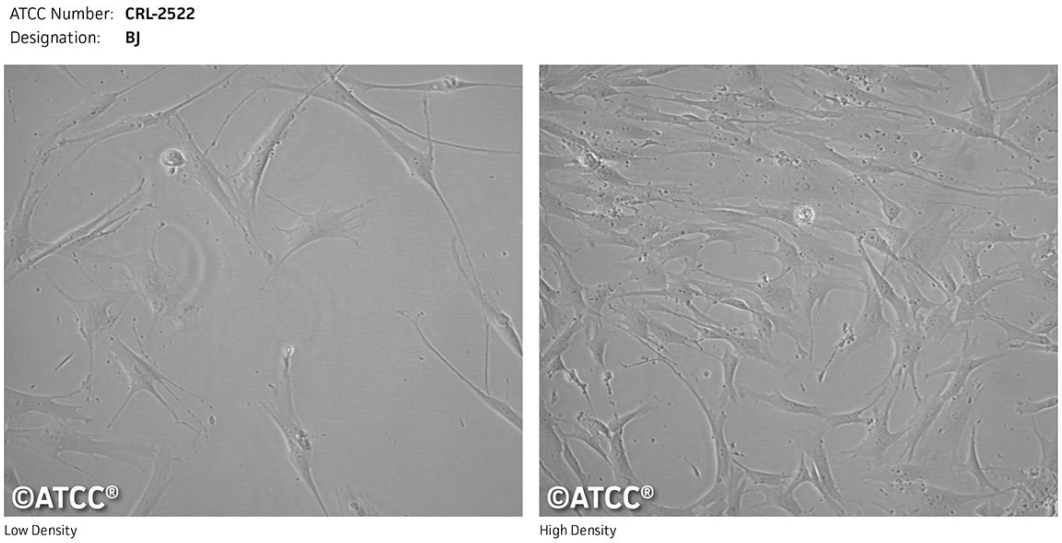
BJ insan fibroblast hücre hattı (CRL-2522, ATCC), %10 fetal sığır serumu (10500064-Gibco), %1 MEM Esansiyel Olmayan Amino Asit Solüsyonu (11140050-Gibco) ve %1 Penisilin-Streptomisin-10.000 U/mL (15140122-Gibco) ile desteklenmiş Dulbecco'nun modifiye kartal besiyeri (11885084-Gibco, Grand Island, NY, ABD) kullanılarak T-75 flasklarda kültürlenmiştir. Hücreler 37°C ve %5 CO_2'de muhafaza edilmiştir. Morfolojik değişiklikler faz kontrast mikroskobu (Zeiss Axio Vert, Oberkochen, Almanya) ile analiz edilmiş; hücre canlılığı tripan mavisi (Thermo-15250061, Thermo Fischer Scientific, ABD) dışlama testi ile belirlenmiş; ve hücre sayımı thoma lam (Marienfeld, Lauda-Koenigshofen,

Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler %70-80 konfluens seviyesinde pasajlanmıştır. Hücreler tripsin-EDTA solüsyonu (25200056-Gibco) kullanılarak hasat edilmiştir. Her üç günde bir kültür ortamı PBS (10010015- Gibco) ile yıkanmıştır ve ortama taze besiyeri eklenmiştir. Bu çalışmada kullanılan prosedürler, birincil kültür, alt kültür ve dondurma işlemi için Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC) teknik bülteni protokollerine uygundur.

2.1.2.1 BJ İnsan Fibroblast Hücreleri

BJ fibroblast hücreleri, normal sünnet derisi fibroblastlarından türetilen bir insan fibroblast hücre hattıdır [258] (Şekil 2.1). Bu diploid hücre hattı normal insan kromozom sayısını korur ve hücre biyolojisi, yaşlanma ve hücresel yaşlanma dahil olmak üzere çeşitli biyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılır [259, 260]. BJ fibroblast hücreleri özellikle hücre çoğalması, farklılaşması, yaşlanması ve strese ya da yaralanmaya verilen yanıt üzerine yapılan araştırmalar için değerlidir ve yara iyileşmesi ve doku onarımı gibi süreçlere dair içgörüler sağlar.

BJ hücre hattı, optimum büyüme ve canlılığı sağlamak için belirli koşullar altında kültürlenmiştir. Önerilen koşullar %95 hava ve %5 CO_2 atmosferi ile 37°C sıcaklık ortamıdır. Dondurulmuş hücreleri çözerken ve kültürü başlatırken, hücre canlılığını korumak için prosedür hızlı bir şekilde ve aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Hücreler tipik olarak uygun bir büyüme ortamında muhafaza edilmiştir ve kültür kabı boyutuna bağlı olarak 1:2 ila 1:9 oranında alt kültürleme yapılmıştır. Deneylerde 7 ila 12. pasaj sayısı aralığında hücreler kullanılmıştır. Hücre büyümesini ve çoğalmasını desteklemek için her 2 ila 3 günde bir düzenli ortam yenilenmiştir. Ayrıca, Tablo 2.4'de belirtildiği gibi hücre hattı ATCC kalite kontrol prosedürlerine göre karakterize edilmiştir (https://www.atcc.org).



Şekil 2.1 BJ Fibroblast hücreleri hücre hattı mikroskop görüntüsü **(**https://www.atcc.org**)**

Tablo 2.4 Çalışmada kullanılan hücre tipi ve hücrenin özellikleri

Hücre: BJ
ATCC Kodu: CRL-2522TM
Büyüme Özelliği: Adherent (Yapışan)
Organizma: Homo sapiens
Hücre Tipi: Fibroblast
Organ: Deri
Hastalık: Normal

2.1.3 BJ İnsan Fibroblast Hücreleri Complete Medium Hazırlanması

- Tam besiyerleri 50 ml steril tüplere hazırlanmıştır. Hazırlanan tam besiyerleri maksimum 5 gün kullanılacak hacimlerde stoklanmıştır.
- High Glikoz DMEM (Gibco) besiyeri üzerine, %10 oranında inaktive edilmiş steril fetal sığır serum (FBS) (Gibco) eklenmiştir.
- %1 Pen-Strep ve MEM Esansiyel Olmayan Amino Asit Solüsyonu eklenmiştir.
- Kullanılıncaya kadar tüplerin kapak kısmı parafilmlenmiş ve alikotlanmış olarak +4°C'de saklanmıştır.

2.1.4 Dondurulmuş Hücrelerin Çözdürülmesi

- Tam besiyeri ortamı, 37°C su banyosunda inkübe edilerek uygun sıcaklığa getirilmiştir.
- Dondurulmuş BJ insan fibroblast hücreleri sıvı azot tankından çıkarılmıştır.
- Kryotüp, 37°C su banyosuna transfer edilip çözünmesi için 60 sn bekletilmiştir. Kapak kısmı parafilm ile sarılarak suya batması engellenmiştir.
- Hücreler 15 ml'lik bir santrifüj tüpüne transfer edilmiştir.
- 37°C sıcaklıkta 5 ml tam besiyeri yavaşça eklenmiştir.
- Hücreler, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür.
- Santrifüj sonrası süpernatan pipetle aspire edilmiştir.
- Çöktürülen hücre pelleti üzerine yavaş bir şekilde 10 ml tam besiyeri eklenmiştir.
- Hücreler yavaş pipetleme ile iyice süspanse edilerek 75 cm^2'lik flasklara aktarılmıştır.
- Hücrelerin morfolojisi ve flask içindeki homojen dağılımı faz-kontrast mikroskobu ile incelenmiştir.
- Hücreler, 37°C ve %5 CO_2 ortam koşulları altında inkübe edilmiştir.
- Kültürün 24 saati sonrasında hücre tutunması ve canlılığı kontrol edilmiştir.

- Taze besiyeri ortamı ile ortam değiştirilmiş ve hücreler pasaj için hazır olana kadar 37°C'de %5 CO_2 inkübatörde büyütülmeye devam edilmiştir.
- Hücrelerin günlük takibi düzenli olarak yapılmıştır.
- Flask %70-80 konfluent olduğunda hücre pasajlama işlemi yapılarak hücreler 2 yeni 75 cm²'lik flasklara aktarılmıştır.



Şekil 2.2 BJ fibroblast hücre canlılığı kontrolü

2.1.5 Hücrelerin Pasajlanması ve Subkültüre Edilmesi

- -20°C'de muhafaza edilen Trypsin/EDTA çözeltisi oda sıcaklığında çözülmüştür. Nazikçe karıştırılarak homojenize edilmiştir.
- +4°C'de saklanan pH 7.4 PBS çözeltisi (Ca_2^+ ve Mg_2^+ olmadan) ve hücre kültürü besiyeri ortamı oda sıcaklığına getirilmiştir.
- Faz kontrast mikroskobu altında, hücrelerin % 70-80 konfluansa ulaştığı ve kontamine olmadığı sağlıklı bir durumda olduğu doğrulanmıştır.
- Hücre kültürü besiyeri ortamı dikkatlice pipetle alınarak hücre tabakasına mümkün olduğunca dokunulmamıştır.
- Hücre tabakası pH 7.4 PBS çözeltisi (Ca_2^+ ve Mg_2^+ olmadan) ile yıkanmıştır (yaklaşık 75 cm² başına 10 ml PBS çözeltisi).
- Hücre tabakasını tamamen kaplayacak şekilde oda sıcaklığına getirilmiş trypsin/EDTA çözeltisi eklenmiştir (75 cm² hücre tabakası için 2500 µl yeterlidir).
- Trypsin/EDTA çözeltisi hücre tabakası üzerinde inkübatörde 37°C'de yaklaşık 5 dakika inkübe edilmiştir. Hücreler yuvarlanmaya başladığında ve şişenin dibinde yüzdüklerinde tripsinizasyon durdurulmuştur. Tüm hücrelerin ayrıldığını kontrol etmek için faz kontrast mikroskobu kullanılmıştır.
- Trypsin, taze hücre kültürü ortamına doğrudan alınarak inhibe edilmiştir (75 cm² hücre tabakası için yaklaşık 7 ml). Bu yıkama adımı tekrar edilmiştir (3 kez)
- Hücre süspansiyonu yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmış ve hücreler santrifüj edilmiştir (5 dakika, 1500 rpm).
- Santrifüjden sonra, fazla ortam alınmış ve hücre pelleti taze hücre kültürü ortamında yeniden süspanse edilmiştir. İstenen hücre yoğunluğunu elde etmek için uygun miktarda ortam kullanılmıştır.
- Hücre süspansiyonu daha sonra yeni flasklara aktarılmıştır. Flasklar laminar akış kabininde kuzey, güney, doğu, batı hareketi ile nazikçe hareket ettrilmiş ve hücreler eşit şekilde dağıtılmıştır.



Şekil 2.3 BJ fibroblast hücre hattının çoğaltılması

2.1.6 Hücrelerin Dondurulması

- Sadece sağlıklı ve hızla bölünen hücreler dondurulmuştur.
- Dondurmadan bir veya iki gün önce, hücreler taze besi ortamına 1:5 oranında bölünmüş ve kültürde tutulmuştur.
- Dondurma günü, hücreler sayılmıştır.
- Her dondurma tüpünde 1-2x10^6 hücre bulunmuştur.
- Uygun hacimde hücreler steril bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Pellet'i dağıtmadan süpernatant dikkatlice çıkarılmıştır.
- Hücre pelletleri, %10 DMSO ve %90 ısıl işlem görmüş FBS içeren 1 ml dondurma ortamında nazikçe süspanse edilmiştir.
- 1 ml hücre süspansiyonu bir kryotüpe aktarılmıştır. Kryotüpler üzerine tarih, pasaj sayısı yazılmıştır.
- Tüp sıkıca kapatılmıştır (sadece parmak sıkılığı), böylece sıvı azot tüpe girmemiştir.
- Kapalı tüpler hücrelerin yavaşça soğumasını sağlayan izopropil alkollü özel bir dondurma kabına yerleştirilmiştir.
- Dondurma kabı kapatılmış ve en az 4 saat -80°C'de bekletilmiştir.
- Dondurulmuş hücre tüpleri daha sonra sıvı azota aktarılmıştır.
- DMSO'ya uzun süre maruz kalmak hücreler için toksik olabileceği için. Aynı anda en fazla 5 tüp hücre dondurulmuştur**.**

2.1.7 Biyokimyasal Analizler İçin Hücre Lizatı Hazırlama

Hücre lizatı hazırlamak için hücreler 75 cm^2'lik flasklarda büyütülmüştür. flasklarda bulunan hücre ortamı aspire edilmiştir. Önceden hazırlanmış olan -20°C'de hafif buzlu pH 7.4 PBS'den her bir flaska 5 ml hacimde ilave edilmiştir. Daha sonra cell scraper (steril hücre kazıyıcısı) ile flask içinde başlangıç noktası belirlenerek sağa sola sadece el bileği hareket ettirilerek tabandaki yapışmış olan hücreler kazınarak kaldırılmıştır. Kazınarak kaldırılmış hücreler 15 ml santrfüj

tüpte toplanmıştır. Tüplere aktarma işlemi bitinceye kadar tüpler soğuk zemin buz üzerinde tutulmuştur. Aktarma işlemi sonrası hızlı bir şekilde soğutmalı santrifüjde (+4°C) 1500 rpm 5 dakika boyunca santrifüj edilerek çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yıkama için soğuk 1 ml pH 7.4 PBS ile hücreler 1500 rpm2de 5 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Son yıkamadan sonra 400 µl RIPA lysis buffer ve %1 PMSF protease inhibitor eklenmiştir. Sonrasında köpürmeyi engelleyecek şekilde hafifçe pipetaj yapılmıştır. Bu işlem sonrasında 1500 rpm 5 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatantlar 2 ml'lik tüplere alınmıştır çalışma yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır.

2.1.8 Oksidatif Stres Kaynaklı Yaşlanma Modelinin Geliştirilmesi

Bu bölümde, erken senesensi indüklemek için gereken minimum oksidatif stres tedavisi dozu ve süresi belirlenmiştir. BJ hücrelerinde erken senesensi indüklemek için tek aşamalı bir oksidatif stres modeli kullanılmıştır [261]. Hücre ikiye katlanma süresi, SA-βgal aktivitesi ve MTT deneyleri kullanılarak H_2O_2 ve CA'nın sublethal dozları belirlenmiştir. Bu adımlar, stres kaynaklı erken senesensi incelemek ve CA etkilerini değerlendirmek için güvenilir bir model oluşturmuştur.

2.1.8.1 Doubling Time Hesaplanması

Yaklaşık 50,000 hücre her gün için bir 25 cm^2 flask'a ekilmiş ve hücre sayımı on gün boyunca üç tekrar halinde 24 saatlik aralıklarla gerçekleştirilmiştir. Hücreler Thoma lam (Marienfeld) ile sayılmıştır. İki katına çıkma süreleri GraphPad Prism (Mac için Sürüm 8.4.0, GraphPad Software, San Diego, California, ABD) ile hesaplanmıştır.

2.1.8.2 Senesens β-Galaktosidaz Boyama (SA-βgal)

pH 6 SA-βgal aktivitesi, senesens modelini belirlemek ve ikiye katlama süresini doğrulamak için kullanılmıştır. Hücreler 5 x 10^4 hücre/kuyu yoğunluğunda ekilmiş ve ekimden 24 saat sonra yoğunlukları gözlemlenmiştir. Hücre boyaması, iki katına çıkma süresi analizinin sonuçlarına göre 3, 6 ve 9. günlerde gerçekleştirilmiştir. Senesens β-galaktosidaz boyama ticari kit (ab102534 SA-βgal boyama Kiti, Abcam, Cambridge, MA, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

Aşağıdaki protokol, 12 kuyulu bir plakadaki her kuyu için tasarlanmıştır.

- Reaktif Hazırlama

a) 1X PBS : Kuyu başına 3 mL hazırlanmıştır.
b) X-gal Solüsyonunu Hazırlama: 20 mg X-gal tartılmış, 20X stok solüsyonu hazırlamak için 1 mL DMSO içinde çözülmüştür. Stok solüsyon polipropilen tüpte saklanmıştır.

- Numune Hazırlama

a) Kültür ortamı uzaklaştırılmıştır ve hücreleri bir kez 1 mL 1X PBS ile yıkanmıştır.
b) Hücreler 0,5 mL fiksatif ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.

- Boyama Solüsyon Karışımı

Hücreler fiksatif solüsyonda inkübe edilirken boyama solüsyonu hazırlanmıştır. Yalnızca polipropilen plastik bir tüp kullanarak karıştırılmıştır. Toplam kuyucuk sayısı için yeterli miktar çözelti hazırlanmıştır. Aşağıda her kuyucuk için gerekli karışım bileşen miktarları verilmiştir.

- Her kuyucuk için

– Boyama Solüsyonu 470 µL
– Boyama Takviyesi 5 µL
– DMSO içinde 20 mg/ml X-gal 25 µL
– Hücreler 1 ml 1X PB ile iki kez yıkanmıştır.

- Her bir kuyucuğa 0,5 ml boyama solüsyon karışımı eklenip plaka parafilm ile hava almayacak şekilde paketlenmiştir. Plaka * CO_2 'siz ortamda 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir.
- Genel olarak 37°C inkübatörlerde bulunan CO_2 seviyeleri, boyama solüsyonunun pH'ını düşürür. bu sayede renk gelişimini etkiler. CO_2' den herhangi bir etkiyi önlemek için plaka kapatılabilir bir torbaya konulmuştur.
- Mavi rengin gözlemlenmesi için rastgele seçilen görüş alanlarından, floresan mikroskobu (Zeiss Axio Vert) kullanılarak 4x, 10x, 20x ve 40x büyütmede 7 görüntü çekilmiştir. Tüm prosedürler üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir.

2.1.8.3 Oksidatif Stres Ajanı H_2O_2'nin Subletal Dozunun Belirlenmesi

Oksidatif Stres Kaynaklı Erken Yaşlanma (SIPS) modeli için subletal H_2O_2 doz aralığı, bir tetrazolyum boya (MTT) deneyi kullanılarak belirlenmiştir. Bu test mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesini ölçer. Canlı hücrelerdeki mitokondriyal enzimler sarı MTT tetrazolyum tuzunu çözünmeyen mor bir formazan ürününe dönüştürür ve formazan miktarı hücre canlılığıyla ilişkilidir [262]. BJ fibroblast hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 1×10^4 hücre/kuyucuk başına konsantrasyonunda ekilmiştir. Daha sonra, plakalar 37°C ve %5 CO_2'de inkübe edilmiştir. Ortam 24 saat sonra çıkarılmış ve çeşitli konsantrasyonlarda H_2O_2 (100-1000 µM) eklenmiştir. 3 saatlik inkübasyondan sonra, kültür ortamı tamamen 0,5 mg/ml konsantrasyonda tetrazolyum boyası (T0793-MTT boyası, Bio Basic, Kanada) içeren taze bir ortamla değiştirilmiştir. Plaka 37°C ve %5 CO_2'de 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, ortam atılmış ve 100 µL DMSO (S-002-M- Sigma-Aldrich, ABD) eklenmiştir. Absorbansı 570 ve 690 nm dalga boylarında (arka plan ölçümleri için) belirlemek için çok işlevli bir plaka okuyucu (Epoch 2, BioTek, Santa Clara, CA, ABD) kullanılmıştır. Deney 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı formazan absorbansının yüzdesi hesaplanarak ölçülmüştür. Hücre canlılığı (%) aşağıdaki denklem (2.1) ve düzeltilmiş veriler kullanılarak hesaplanmıştır:

Kontrol: kontrol grubunun 570-690 nm'deki absorbansıdır (işlemsiz).

Tedavi: tedavi grubunun 570-690 nm'deki absorbansıdır.

$$Hücre\ canlılığı = 100 \times \left(\frac{Atedavi}{Akontrol}\right) \quad (2.1)$$

2.1.8.4 Şelidonik Asit Subletal Doz Aralığının Belirlenmesi

Yukarıda açıklandığı gibi, Şelidonik asit'in hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini analiz etmek için MTT testi kullanılmıştır. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara kuyu başına 1×10^4 hücre yoğunluğunda ekilmiş ve 10-4000 µM arasında değişen CA konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Değişen tedavi sürelerinin etkisini değerlendirmek için 24, 48 ve 72 saatlik maruz kalma süreleri dikkate alınmıştır. Kontrol grubundaki hücrelere herhangi bir muamele uygulanmamıştır; muamele grupları için belirtilen CA konsantrasyonları uygulanmıştır.

2.1.9 Serbest Radikal ve Antioksidan Aktivite Ölçümleri

2.1.9.1 Senesens β-Galaktosidaz Boyama (SA-βgal)

Senesensin bilinen biyokimyasal karakteristiği, SA-ß-gal yani senesense bağlı olarak ortaya çıkan β-galaktozidaz aktivitesinde görülen aşırı artıştır. SIPS çalışmaları, kuyu başına 5×10^4 hücre yoğunluğunda kültürlenen BJ fibroblast hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra, kontrol grubu hariç tüm deney grupları, erken senesensi indüklemek için 37°C'de 3 saat boyunca 200 µM H_2O_2 ile muamele edilmiştir. 3 saatlik tedavinin ardından, H_2O_2 ile tedavi edilen gruptaki ortam tam bir ortamla değiştirilmiştir. Ardından, CA gruplarına 72 saat boyunca 250 ve 500 µM CA konsantrasyonları uygulanmıştır. Çalışma solüsyonları tam kültür ortamında (319-066CL-DMEM, Wisent, Kanada) hazırlanmıştır. Senesens β-Galaktosidaz boyaması ticari bir kit (ab102534 SA-βgal boyama Kiti, Abcam) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme için rastgele yedi görüş alanı seçilmiş ve görüntüler bir floresan mikroskobu (Zeiss Axio Vert) kullanılarak 4x, 10x ve 20x büyütmelerde elde edilmiştir. Aşağıdaki protokol, 12 kuyulu bir plakadaki her kuyu için tasarlanmıştır.

- Reaktif Hazırlama

a) 1X PBS : Kuyu başına 3 mL hazırlanmıştır.

b) X-gal Solüsyonu Hazırlama: 20 mg X-gal tartılmıştır ve 20X stok solüsyonu hazırlamak için 1 mL DMSO içinde çözülmüştür. Stok solüsyon polipropilen tüpte saklanmıştır.

- Numune Hazırlama

a) Kültür ortamını uzaklaştırılmıştır ve hücreleri bir kez 1 mL 1X PBS ile yıkanmıştır.

b) Hücreler 0,5 mL fiksatif ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.

- Boyama Solüsyon Karışımı

Hücreler fiksatif solüsyonda inkübe edilirken boyama solüsyonu hazırlanmıştır. Yalnızca polipropilen plastik bir tüp kullanarak karıştırılmıştır. Toplam kuyucuk sayısı için yeterli miktar çözelti hazırlanmıştır. Aşağıda her kuyucuk için gerekli karışım bileşen miktarları verilmiştir.

- Her kuyucuk için:

– Boyama Solüsyonu 470 µL
– Boyama Takviyesi 5 µL
– DMSO içinde 20 mg/ml X-gal 25 µL
– Hücreler 1 ml 1X PB ile iki kez yıkanmıştır.

- Her bir kuyucuğa 0,5 ml boyama solüsyon karışımı eklenip plaka parafilm ile hava almayacak şekilde paketlenmiştir. Plaka * CO_2 'siz ortamda 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir.
- Genel olarak 37°C inkübatörlerde bulunan CO_2 seviyeleri, boyama solüsyonunun pH'ını düşürür. bu sayede renk gelişimini etkiler. CO_2' den herhangi bir etkiyi önlemek için plaka parafilm ile hava almayacak şekilde paketlenmiştir.
- Mavi rengin gözlemlenmesi için rastgele seçilen görüş alanlarından, floresan mikroskobu (Zeiss Axio Vert) kullanılarak 4x, 10x, 20x ve 40x büyütmede 7 görüntü çekilmiştir. Tüm prosedürler üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir.

2.1.9.2 Sitotoksisite Testi: AO/DAPI Çift Boyama

- 4′,6-Diamino-2-Fenilindol (DAPI) Boyama

Nükleer morfoloji ve bütünlüğü görmek için DAPI (4′,6-diamino-2-fenilindol, 62248, Thermo Fischer Scientific) boyama yöntemi kullanılmıştır [263]. SIPS sonrası kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Hücreler iki kez PBS (1X) ile yıkanmış, ardından 30 dakika boyunca 37 °C'de sabitleme reaktifi (4% paraformaldehit) ile inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler iki kez daha PBS ile yıkanmıştır. DAPI (0.5 µg/mL) eklenmiş ve sabitlenmiş hücreler yaklaşık 30 dakika boyunca 37 °C'de

inkübe edilmiştir. Ardından DAPI çözeltisi ortamdan uzaklaştırılmıştır. Son olarak hücreler iki kez PBS ile yıkanmıştır. DNA'ya bağlanan boyalar, floresan mikroskobu (Zeiss Axio Vert) kullanılarak görüntülenmiştir. Rastgele seçilen görüntü alanından toplamda 7 adet görüntü (4×, 10× ve 20× büyütme) elde edilmiştir.

- Akridin-Orange Boyama (AO)

Hücre içi asidik vakuolleri, otolizomları ve otolizomal aktiviteleri gözlemlemek için akridin-orange boyama (GT9731, Glentham Life Sciences, Corsham, UK) yöntemi kullanılmıştır [264]. PBS içinde toplamda 1 µg/mL akridin orange çözeltisi, %5 CO_2 ve 37 °C'de 10 dakika boyunca uygulanmıştır. Hücreler daha sonra iki kez PBS ile yıkanmıştır. Rastgele seçilen bir görüntü alanından toplamda 7 adet görüntü (4×, 10× ve 20× büyütme) AO filtreleri ile donatılmış floresan mikroskobu kullanılarak elde edilmiştir (kırmızı floresan için 488 nm'de uyarma ve 590 nm'de yayılma, Zeiss Axio Vert).

2.1.9.3 Genotoksisite Analizi:Comet Testi

BJ hücrelerindeki DNA hasarını değerlendirmek için alkalin comet deneyi kullanılmıştır. Deney, üreticinin protokolüne göre gerçekleştirilmiştir (ab238544 Comet Assay kit, Abcam). Örnek başına elli hücre analiz edilmiştir (2.3 ve 2.4). ImageJ OpenComet yazılımı [265] kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA'nın niceliksel değerlendirmelerini yapmak için kullanılmıştır.

Kuyruk Momenti aşağıdaki yöntemler kullanılarak ölçülmüştür:

$$Kuyruk\ DNA\% = 100 \times \text{Kuyruk DNA Yoğunluğu}/\text{Hücre DNA Yoğunluğu} \quad (2.2)$$

$$Zeytin\ Kuyruk\ Momenti = \text{Kuyruk DNA\%} \times \text{Kuyruk Moment Uzunluğu} \quad (2.3)$$

$$Kuyruk\ Momentinin\ Genişliği = \text{Kuyruk DNA\%} \times \text{Kuyruk Uzunluğu} \quad (2.4)$$

- Reaktif Hazırlama

Deney günü sadece ihtiyaç duyulan kadar reaktif hazırlanmıştır.

- Comet Agaroz

Comet Agarose, ısıtılarak 90-95ºC'de su banyosunda 20 dakika bekletilmiş veya agaroz sıvılaşana kadar ısıtılmıştır. Şişe, 37ºC'de su banyosuna aktarılmış ve homojen hale gelene kadar 20 dakika bekletilmiştir.

- Vista Green DNA Dye

1X Vista Green DNA Boyama Çözeltisi, sağlanan stoğun 1/10000 oranında TE Tamponu (10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA) içinde seyreltilerek hazırlanmıştır. Bu çözelti, ışık korumalı olarak 4ºC'de 3 haftaya kadar saklanabilir. İyice karıştırılmıştır.

- Lizis Tampon Çözelti

100 mL 1X Lysis Buffer hazırlanması için:

– 14.6 g NaCl
– 20 mL EDTA Çözeltisi(kit sağlanan)
– 10 mL 10X Lysis Çözeltisi (kit sağlanan)
– 10 mL DMSO
– Steril H_2O hacmi 90 mL'ye ayarlanmıştır.
– NaCl'nin çözülmesi için iyice karıştırılmıştır. Lysis Buffer, yavaşça 10 N NaOH ile pH 10.0'a ayarlanmış, ardından saf H_2O ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Kullanımdan önce 4ºC'ye kadar soğutulmuştur.

- Alkali Çözelti

100 mL Alkaline Solution hazırlanması için:

– 1.2 g NaOH
– 0.2 mL EDTA Çözeltisi (sağlanan)
– Saf su H_2O hacmi 100 mL'ye ayarlanmıştır.
– NaOH'nin çözülmesi için iyice karıştırılmıştır. Alkali Çözelti, kullanımdan önce 4ºC'ye kadar soğutulmuştur.

- Elektroforez Yürütme Çözeltisi

Alkali elektroferezi hassastır ve daha küçük DNA hasarlarını tespit etmesi hedeflenmiştir. Alkali elektroferezi, tek iplikçikli ve çift iplikçikli DNA kırıklarını,

AP bölgelerinin çoğunu ve alkaliye duyarlı DNA adüktlerini tespit etmesi hedeflenmiştir.

- Alkali Elektroforez Çözeltisi (300 mM NaOH, pH >13, 1 mM EDTA)

1 L Alkali Yürütme Çözeltisi hazırlanması için

– 12 g NaOH
– 2 mL EDTA Çözeltisi (sağlanan)
– Saf su H_2O hacmi 1 L'ye ayarlanmıştır.
– NaOH'nin çözülmesi için iyice karıştırılmıştır. Alkali yürütme çözeltisi, kullanımdan önce 4ºC'ye kadar soğutulmuştur.

- Deneyin gerçekleştirilmesinden önce Lizis tampon çözelti, Alkali çözelti ve Electroforez yürütme çözeltisi hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler iyice 4ºC'ye soğutulmuştur.
- Comet agarose, 90-95ºC'de su banyosunda 20 dakika veya agaroz sıvı hale gelene kadar ısıtılmıştır. Agarozu soğutmak için şişe 37ºC'de su banyosuna aktarılmış ve 20 dakika bekletilmiştir.
- Her bir kuyucuğa base layer oluşturmak için comet slide üzerine her bir kuyucuğa 75 µL comet agarose eklenmiştir. Çözeltinin pipet ucu ile yayılmasıyla tam kuyu kaplaması sağlanmıştır. Lam yatay tutulmuş ve 15 dakika boyunca 4ºC'ye transfer edilmiştir.
- Hücre numuneleri, kontroller dahil olmak üzere aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Adherent Hücreler: Hücreler flask/tabaktan kauçuk bir spatula ile nazikçe kazınarak çıkarılmıştır. Hücre süspansiyonu konik bir tüpe transfer edilmiş ve 700 x g'de 2 dakika santrifüj edilip süpernatan atılmıştır. Hücre pellet'i bir kez buz soğukluğunda PBS (Mg_2^+ ve Ca_2^+ içermeyen) ile yıkanmış, santrifüj edilmiş ve süpernatan atılmıştır. Son olarak, hücreler 1 x 10^5 hücre/mL olacak şekilde buz soğukluğunda PBS'de (Mg_2^+ ve Ca_2^+ içermeyen) süspanse edilmiştir.

- Hücre numuneleri, 1/10 oranında (v/v) Comet agarose ile birleştirilmiş, iyice karıştırılmış ve hemen her bir kuyuya Comet agarose base layer üzerine 75 µL eklenmiştir. Pipet ucu ile çok nazik ve dikkatli bir şekilde süspansiyon yayılması sağlanarak tamamen kuyuyu kaplaması sağlanmıştır.
- Lamı Hazırlama

Lam yatay olarak tutulmuş ve karanlıkta 15 dakika boyunca 4ºC'ye transfer edilmiştir.

- Lyzis Tampon Çözelti İle İşlem

Lam dikkatlice, önceden soğutulmuş lysis buffer içeren (~25 mL/lam) küçük bir kaba/damlaya transfer edilmiştir. Lam, karanlıkta 4ºC'de 30-60 dakika süreyle tampon içinde tutulmuştur.

- Alkali Çözelti ile İşlem

Lysis buffer dikkatlice aspire edilip yerine önceden soğutulmuş Alkaline solüsyon (~25 mL/lam) eklenmiştir. Lam, karanlıkta 4ºC'de 30 dakika süreyle çözeltide tutulmuştur.

- Alkali Elektroforez

– Lam yatay olarak tutulmuş ve Alkali çözleti'den dikkatlice alınarak yatay elektroforez hücresine transfer edilmiştir. Hücre, lamı kaplayacak kadar soğuk Alkali elektroforez çözelti ile doldurulmuştur.

– Hücreye 15-30 dakika boyunca 1 volt/cm voltaj uygulanmıştır. Ayrıca, akım ayarının 300 mA olacak şekilde alkali elektroforez çözelti hacmi ayarlanmıştır.

– Lam yatay olarak tutulmuş ve elektroforez hücresinden dikkatlice çıkarılarak temiz, küçük bir kaba transfer edilmiştir. Lam, yaklaşık 25 mL soğutulmuş saf su ile 2 dakika boyunca daldırılmış, aspire edilmiş ve bu işlem iki kez daha tekrarlanmıştır.

– Son su durulaması aspire edilip yerine 5 dakika boyunca soğuk %70 etanol eklenmiştir.

– Lam yatay olarak tutulmuş ve %70 etanol içinden çıkarılarak hava ile kurutulmuştur.

– Agaroz ve lam tamamen kuruduktan sonra, her yuvaya 100 µL seyreltilmiş Vista Green DNA Dye eklenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.

– Rastgele seçilen bir görüntü alanından toplamda 7 adet görüntü (4×, 10× ve 20× büyütme) alınmıştır. Floresan mikroskopi kullanarak FITC filtresi ile lamlar incelenmiştir.

2.1.9.4 Hidrojen Peroksit Seviyesi Ölçümleri

H_2O_2 miktarı, üretici talimatlarına göre Hidrojen Peroksit Test Kiti (ab102500, Abcam, Cambridge, MA, USA) kullanılarak belirlenmiştir. Bu testte, renkli bir ürün (λmax = 570 nm) oluşturmak için horseradish peroksidaz, bir prob ve H_2O_2 kullanılır. Her mikrotitre plakasına standartlar eklenmiş ve her test karışımına ve H_2O_2 standartlarına 50 µL reaksiyon karışımı eklenmiştir. Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Absorbans ölçümleri, 570 nm'de bir mikro-plaka okuyucu (Epoch 2, BioTek) kullanılarak elde edilmiştir. H_2O_2 konsantrasyonu (nanomolar olarak) H_2O_2 standart eğrisi ile belirlenmiştir. Sonuçlar, pmol/µl H_2O_2 cinsinden ifade edilmiştir.

- Standart Hazırlama

– Her kullanım için taze bir standart seti hazırlanmıştır.
– Seyreltilmiş standart çözelti kararsızdır ve 4 saat içinde kullanılmıştır.

- 10 mM H_2O_2 Standart Çözeltisinin Hazırlanması

10 µL sağlanan H_2O_2 Standart çözeltisini (0.88 M çözeltisi) 870 µL ddH_2O içinde seyreltilmiştir.

- 0.1 mM H_2O_2 Standart Çözeltisinin Hazırlanması

10 µL 10 mM H_2O_2 Standart çözeltisini 990 µL dH_2O içinde seyreltilmiştir.

- Kolorimetrik Analiz için

0.1 mM standart kullanılarak, standart eğri dilüsyonları mikro santrifüj tüplerinde tablo 2.5'e uygun şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 2.5 Standart eğri dilüsyonları

Standart	Standartın hacmi(µl)	Assay Buffer(µl)	Kyucuktaki Son hacim(µl)	H_2O_2 son konsantrasyonu (nmol/kuyucuk) Kolorimetrik
1	0	150	50	0
2	30	120	50	1
3	60	90	50	2
4	90	60	50	3
5	120	30	50	4
6	150	0	50	5

- Proteinsizleştirme Aşaması

– Protokolde belirtilen şekilde örnekler hazırlanmıştır. Homojenizasyon ve santrifüj işleminden sonra berrak bir protein örneği elde edilmiştir. Örnekler buz üzerinde tutulmuştur.

– Örneklerin üzerine son konsantrasyon 1 M olacak şekilde soğuk Perklorik asit (PCA) 4 M eklenmiş ve iyice karışması için kısa bir süre vortex yapılmıştır. Yüksek protein konsantrasyonlu örnekler daha fazla PCA gerektirmiştir.

– Örnekler 5 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir.

– Örnekler 4°C'de soğuk bir santrifüjde 13,000 x g'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatan temiz bir tüpe aktarılmıştır. Süpernatan hacmi ölçülmüştür.

– Fazla PCA'yı çökeltmek için süpernatanın %34'üne eşit hacimde soğuk 2M KOH eklenmiş ve kısa bir süre vortex yapılmıştır. Bu işlem örneği nötralize etmiş ve fazla PCA'yı çökeltmiştir.

– Nötralizasyondan sonra pH'nın 6.5 – 8 aralığında olduğundan emin olunmuştur (1 µL örneğin pH kağıdı ile test edilmesiyle). pH, pH 0.1 M KOH veya PCA ile ayarlanmıştır.

– Örnekler 4°C'de 13,000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatan toplanmıştır.

– Örnekler artık deproteinize edilmiş, nötralize edilmiş ve PCA çıkarılmıştır. Örnekler artık analiz için hazır hale getirilmiştir.

- Örnek Ayırma Aşaması

Deproteinize edilen örnekler başlangıç konsantrasyonundan seyreltilmiştir. Son örneğin seyreltme faktörünü hesaplamak için aşağıdaki formül (2.5) uygulanmıştır:

$$\%Orjinal\ konsantrasyon = \frac{\text{İlk örnek hacmi}}{\text{İlk örnek hacmi} \times PCA\ hacmi \times KOH\ hacmi} \times 100 \qquad (2.5)$$

- Analiz Prosedürü – Kolorimetrik Analiz

Reaksiyon Kuyu Düzenlemesi

– Standart kuyular = 50 µL standart dilüsyonlar.

– Örnek kuyuları = 2-50 µL örnekler (hacim 50 µL/kuya assay buffer XVIII/Assay Buffer ile ayarlanmıştır).

- Reaksiyon Karışımı

– Her reaksiyon için 50 µL Reaksiyon Karışımı hazırlanmıştır. Yeterli reaktiflerin karışımını sağlamak için reaksiyon karışımının ana karışımı hazırlanmıştır. Aşağıdaki hesaplama (2.6) referans alınmıştır:

$$Toplam\ hacim = 50\mu l\ Reak.karışımı \times (\text{Örnek sayısı} + Standartlar + 1) \qquad (2.6)$$

– 50 µL Reaksiyon Karışımı her kuyuya eklenmiştir.

– Işıktan koruyarak oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.

– Mikro plaka okuyucusunda ölçüm yapılmıştır

– Kolorimetrik analiz: OD_{570} nm ölçülmüştür.

- Hesaplamalar

– Sinyal üreten örnekler, en yüksek standarttan daha fazla ise uygun bir tamponda daha fazla seyreltilip yeniden analiz edilmiştir (2.7), ardından bulunan konsantrasyon uygun seyreltme faktörü ile çarpılmıştır (2.8).

- İstatistiksel nedenlerle, her örneğin en az iki replikatla (dublikasyon) analiz edilmiştir.

– Her standart, kontrol ve örnek için çift okuma ortalaması alınmıştır.

– Tüm standartlar, kontroller ve örnek okumalarından boş (Standart #1) ortalama değeri çıkarılmıştır. Bu, düzeltilmiş absorbans değeridir.

– Her standart için düzeltilmiş değerler, H_2O_2'nin nihai konsantrasyonu fonksiyonu olarak çizilmiştir.
– Bu noktalar boyunca en iyi düzgün eğri çizilmiş ve standart eğri oluşturulmuştur. Standart eğri verilerine dayalı olarak trend çizgisi denklemi hesaplanmıştır (en doğru uyumu sağlayan denklemi kullanarak).
– Standart eğri kullanılarak örnek okumaları ekstrapole edilmiştir.

- Konsantrasyon Hesaplama

$$Sa = \left(\frac{Düzeltilmiş\ Absorbans - (y - intercept)}{Eğim}\right) \quad (2.7)$$

$$\text{Konsantrasyon}\left(\frac{\text{pmol}}{\mu\text{L}}\right) = (Sa \div Sv) \times D \quad (2.8)$$

Burada:

– Sa = Standart eğriden elde edilen örnek miktarı (pmol).
– Sv = Örnek hacmi (µL).
– D = Örnek seyreltme faktörü.

2.1.9.5 Malondialdehit Seviyesi Ölçümleri

Malondialdehit, lipid peroksidasyonunun bir yan ürünüdür [266]. MDA seviyelerini ölçmek için thio-barbiturik asit reaktifi (TBARS) temelli bir test kullanılmıştır [267]. Protokol aşağıda açıklanmıştır:

- Kullanılan Çözeltiler

– %20 Trikloroasetik Asit (TCA) Çözeltisi: 20 g trikloroasetik asit (TCA) (100807-TCA, Merck, Darmstadt, Almanya) tartıldı, distile su ile çözülmüştür, balon joje içerisinde 100 ml distile suya eklenmiş ve karıştırılmıştır. %20 TCA çözeltisi hazırlanmıştır.
– %0,67 Tiyobarbiturik Asit (TBA) Çözeltisi: 0,67 g Tiyobarbiturik Asit (TBA) (T5500-TBA, Sigma-Aldrich, ABD) tartıldı, distile su ile çözülmüştür, balon joje içerisinde 100 ml distile suya eklenmiş ve karıştırılmıştır. %0,67 TBA çözeltisi hazırlanmıştır.

- Yöntem

– 25 µL ön işlemden geçirilmiş hücre lizatı, 175 µL thiobarbiturik asit reaktif çözeltisi ile karıştırılmıştır.

Bu çözeltinin içeriği:

50 µL %0,67 (w/v) TBA

125 µL %20 (w/v) TCA

Karışım, 95°C'de 30 dakika ısıtılmıştır.

– Karışım, hızlıca buz üzerinde 10 dakika soğutulmuş ve ardından 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
– Santrifüj sonrası toplanan süpernatanlar, blank'e karşı 532 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür.
– MDA konsantrasyonları, MDA kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar, hücrelerde mg protein başına nmol MDA olarak ifade edilmiştir.

2.1.9.6 Süper Oksit Dismütaz Aktivite Tayini

- SOD Deney Reaktifleri

0,3 mmol/L Ksantin: 9.13 mg ksantin (mA=152.1 g/mol), distile su ile çözülüp 200 ml distile suya tamamlanmıştır.

0,6 mmol/L EDTA: 22.33 mg EDTA (mA=372.2 g/mol) üzerine saf su aşamalı olarak eklenip çözündükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

150 µmol/L NBT: 12.25 mg NBT (mA=817.6 g/mol) üzerine saf su aşamalı olarak eklenip çözündükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

400 mmol/L Na_2CO_3: 2.54 g Na_2CO_3 (mA=105.93 g/mol üzerine saf su aşamalı olarak eklenip çözündükten sonra son hacim 60 ml'ye tamamlanmıştır.

1g/L bovin serum albumin: 300 mg BSA üzerine saf su aşamalı olarak eklenip çözündükten sonra son hacim 30 ml'ye tamamlanmıştır.

2 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ (Amonyum Sülfat): 1.32 g amonyum sülfat (mA=132.1 g/mol) üzerine saf su aşamalı olarak eklenip çözündükten sonra son hacim 5 ml'ye tamamlanmıştır.

Ksantin Oksidaz Solüsyonu:

0,857 u/mL ksantin oksidaz: 171.4 µl ksantin oksidaz (0.4 u/mg protein) 828.6 µl amonyum sülfat çözeltisi eklenerek son hacim 1 ml'ye tamamlanmıştır.

0,8 mmol/L $CuCl_2$: 13.64 mg CuCl2 (mA=170.48 g/mol), üzerine saf su aşamalı olarak eklenip çözündükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

- Yöntem

– 0.3 ml kloroform, 0.5 ml etanol ve 0,1 ml lizat karıştırılıp, vortekslendikten sonra. 14000 rpm'de 60 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
– Hazırlanan reaktifler karıştırılıp SOD reaktifi hazırlanmıştır.
– 2,45 ml SOD reaktifi üzerine ve 0,5 ml hücre lizatı eklenmiştir.
– Reaksiyonu başlatmak için deney tüpüne 50 µl ksantin oksidaz enzimi eklenip nazikçe vortekslendi ve 25^0C sıcak su banyosunda 20 dakika inkübe edilmiştir.
– 1 ml 0,8 mmol/L $CuCl_2$ solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulmuştur.
– Blank karşı 560 nm absorbans değerlerleri okunmuştur.
– % İnhibisyon değerleri hesaplanmıştır. % İnhibisyon-SOD konsantrasyon kalibrasyon grafiği denklemi kullanılarak SOD değerleri hesaplanmıştır. SOD değerleri mg protein miktarına bölünerek SOD aktivitesi hesaplanmıştır (2.9).

$$\text{İnhibisyon oranı } \% = \left(\frac{Ablank - \text{Asample}}{Ablank}\right) \times 100\% \qquad (2.9)$$

2.1.9.7 Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi Hesaplama

Üreticinin talimatlarına göre, GSH-Px aktivitesi bir Elabscience test kiti (E-BC-K096-S- Elabscience, ABD) ile ölçülmüştür. Glutatyon aktivitesi, indirgenmiş glutatyon tüketimi ölçülerek hesaplanmıştır. H_2O_2 ve GSH, GSH-Px katalizi olmadan reaksiyona girebilir. Bu nedenle, GSH indirgenmesinin enzimatik olmayan reaksiyonla gerçekleşen kısmı çıkarılmıştır. GSH dinitrobenzoik asit ile reaksiyona girerek sarı renkli 5-tiyo-dinitrobenzoik asit anyonu oluşturabilir. Kontrol ve tedavi grupları arasındaki absorbans değerindeki fark GSH-Px aktivitesini gösterir. Reaksiyon karışımının absorbansı 412 nm'de ölçülmüştür. GSH aktivitesi U/mg protein olarak ifade edilmiştir.

- Hücreleri hazırlama

– Her bir test için gerekli olan hücre sayısı toplanmıştır (başlangıç olarak 1×10^6 hücre).

- Hücreler PBS (0.01 M, pH 7.4) ile yıkanmıştır.
- 1×10^6 hücre, 300 µL PBS (0.01 M, pH 7.4) içinde ultrasonikatör ile 4°C'de homojenize edilmiştir.
- Çözünmeyen materyal uzaklaştırılmak için 4°C'de 10 dakika boyunca 12000×rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant toplanıp tespiti için buz üzerinde muhafaza edilmiştir.
- Süpernatantın protein konsantrasyonu belirlenmiştir.

• Enzimatik Reaksiyon

- Enzim İçermeyen Tüp: 0.2 mL 1 mmol/L GSH standart çözeltisi, 5 mL tüpe alınmıştır.
- Enzim Tüpü: 0.2 mL 1 mmol/L GSH standart çözeltisi ve 0.2 mL örnek, 5 mL tüpe alınarak iyice karıştırılmıştır.
- Tüpler, 37°C su banyosunda 5 dakika önceden ısıtılmıştır. Aynı zamanda, stok uygulama çözeltisi de 37°C'de 5 dakika önceden ısıtılmıştır.
- Tüplere 0.1 mL stok uygulama çözeltisi eklenerek iyice karıştırılmıştır. Tüpler, 37°C'de tam olarak 5 dakika boyunca reaksiyona bırakılmıştır.
- Enzim içermeyen tüp: Tüplere 2 mL asit reaktifi ve 0.2 mL örnek eklenmiştir.
- Enzim tüpü: Tüplere 2 mL asit reaktifi eklenmiştir.
- Tüpler, vorteks karıştırıcı ile iyice karıştırılmış ve 7000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantın 1 mL'si, kromojenik reaksiyon için alınmıştır.

• Kromojenik Reaksiyon

- Enzim İçermeyen Kuyu: Enzim içermeyen tüplerin süpernatantından 1 mL alınarak 5 mL tüpe aktarılmıştır.
- Enzim Kuyusu: Enzim tüplerinin süpernatantından 1 mL alınarak 5 mL tüpe aktarılmıştır.
- Boş Kuyular: 1 mL GSH standart uygulama çözeltisi 5 mL tüpe alınmıştır.
- Standart Kuyular: 1 mL 20 µmol/L GSH standart çözeltisi 5 mL tüpe alınmıştır.
- Her tüpe 1 mL fosfat uygulama çözeltisi, 0.25 mL DTNB çözeltisi ve 0.05 mL tuz uygulama çözeltisi eklenmiştir.
- Tüpler iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Spektrofotometre saf su ile sıfırlanarak, her tüpün OD değerleri 412 nm'de mikro plaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür.

ΔA1:Enzim İçermeyen Tüp OD'si - Enzim Tüpü OD'si.

ΔA2: Standart OD'si - Boş Kuyu OD'si.

Konsantrasyon ve Faktörler

c: Standart konsantrasyonu, 20 μmol/L.

f: Numunenin testten önceki seyrelme faktörü.

f1: Enzimatik reaksiyonda serum/plazma seyrelme faktörü, 6 kat.

f2: Enzimatik reaksiyonda doku, hücre veya hücre kültürü süpernatantının seyrelme faktörü, 5 kat.

V: Reaksiyona eklenen numunenin hacmi, mL.

Cpr: Numunedeki protein konsantrasyonu, mgprot/mL.

Not:

Hücre kültürü süpernatantının tanımındaki hacim 0.1 mL ve işlem adımındaki hacim 0.2 mL'dir.

$$GSH\ Aktivite\left(\frac{u}{mgprotein}\right) = \left(\frac{\Delta A1}{\Delta A2}\right) \times c \times f2 \times f \div (V \times Cpr) \qquad (2.10)$$

Bu formül (2.10) ve faktörler, numunenin enzimatik aktivitesinin belirlenmesi için gerekli olan verilerin hesaplanmasında kullanılmıştır.

2.1.10 Gen Ekspresyonu ve Protein Analizi

2.1.10.1 Kantitatif, Gerçek Zamanlı PCR

Amplifikasyon için seçilen primer çiftleri, Primer3web versiyon 4.1.0 (http://primer3.ut.ee/) kullanılarak dikkatlice tasarlanmış ve qRT-PCR primer tasarım kurallarına uygun hale getirilmiştir [268]. Bu araştırma için formüle edilen primer çiftlerinin detayları Tablo 2.6'da sunulmuştur.

Tablo 2.6 Çalışmada kullanılan primer özellikleri

ID	Gene			%GC	Tm	Pair Base
M33647.1	**pRB1**	Forvard	TCACATTCCTCGAAGCCCTT	50	59.02	20
		Reverse	ACGGTCGCTGTTACATACCA	50	59.11	20
DQ263704.1	**p53**	Forvard	TGGCCATCTACAAGCAGTCA	50	59.02	20
		Reverse	GGTACAGTCAGAGCCAACCT	55	59.02	20
L27211.1	**p16**	forward	CCTCAGACATCCCCGATTGA	55	58.88	20
		reverse	GGACATTTACGGTAGTGGGG	55	57.68	20
BC000312.2	**p21**	forward	GGGCTGGGAGTAGTTGTCTT	55	59.02	20
		reverse	AGCCGAGAGAAAACAGTCCA	50	58.95	20
AF083106.2	**SIRT1**	forward	CCAGCCATCTCTCTGTCACA	55	59.1	20
		reverse	AACCTGTTCCAGCGTGTCTA	50	58.85	20
NM_001618.4	**PARP1**	forward	AGAAAAGGCGATGAGGTGGA	50	59.02	20
		reverse	AGCTCGTCCTTGATGTTCCA	50	59.02	20
U06454.1	**AMPK**	forward	GCGTCAAGGAATCCGAAGTC	55	59	20
		reverse	AGCTCGGTAAACTTCAGCCA	50	59.31	20
HM446346.1	**Nrf2**	forward	GGTTGCCCACATTCCCAAAT	50	59.02	20
		reverse	AGCAATGAAGACTGGGCTCT	50	59.01	20
AF488551.1	**APEX1**	forward	CCCTACCCAGCCCAGTTAAA	55	59.00	20
		reverse	CTCTCCCCACATTGTGTCCT	55	59.01	20
AY217036.1	**Bax**	forward	GATGACCCTCTGACCCTAGC	60	58.96	20
		reverse	CGGGCATTAAAGAGCTGGAC	55	58.98	20
JF919224.1	**CytochromeC**	forward	CAGGTAGGGGAGTTGGGATC	60	58.87	20
		reverse	TGTAAAGCCACCTCTCCCTG	55	59.02	20
NM_001101.5	**β-Actin (Kontrol gen)**	forward	CCCTGGAGAAGAGCTACGAG	60	58.97	20
		reverse	CGTACAGGTCTTTGCGGATG	55	59	20

- RNA Ekstraksiyonu ve Saflaştırma

Hazırlık

- Tezgah %70 etanol ve RNase Away ile temizlenmiştir.
- RNA ekstraksiyonu için RNase-free bariyer filtre uçları kullanılmıştır.
- Wash Buffer II ilk kez kullanılmadan önce:
  a. 96-100% etanol doğrudan Wash Buffer şişesine 60 mL eklenmiştir.
  b. Etanol ile karıştırılmış Wash Buffer II oda sıcaklığında saklanmıştır.
- Her saflaştırma için %1 2-merkaptoetanol içeren taze Lysis Buffer hazırlanmıştır.

Yöntem

- Hücre pelletleri -80°C derin dondurucudan çıkarılıp buz üzerine yerleştirilmiştir (sonraki adımlar oda sıcaklığında yapılmıştır).
- Hücre pelletlerine 300 µL Lysis Buffer eklenmiştir.
- Hücre pelletleri iyice karışana kadar yüksek hızda 10 saniye boyunca vortekslenmiştir.
- Lizat, RNase-free Eppendorf tüpüne yerleştirilen bir homojenizer spin kolona aktarılmış ve 12,000 × g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında homojenizer kartuşu çıkarılıp atılmıştır.
- Hücre homojenatına 300 µL %70 etanol eklenmiştir.
- Etanol ekledikten sonra oluşabilecek görünür çökeltileri dağıtmak için iyice karıştırılmıştır.
- Örnek bir spin kartuşuna (toplama tüpü ile birlikte) aktarılmıştır.
- 12,000 × g'de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Flow-through atılmış ve spin kartuşu aynı toplama tüpüne tekrar yerleştirilmiştir.
- Spin kartuşuna 700 µL Wash Buffer I eklenmiştir. 12,000 × g'de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Flow-through ve toplama tüpü atılmıştır. Spin kartuşu yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Spin kartuşuna 500 µL (etanol eklenmiş) Wash Buffer II eklenmiştir.
- 12,000 × g'de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Flow-through atılmış ve spin kartuşu aynı toplama tüpüne tekrar yerleştirilmiştir.
- Son 2 adım bir kez daha tekrarlanmıştır.

- RNA içeren membranı kurutmak için spin kartuşu 12,000 × g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpü atılmış ve spin kartuşu yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- Spin kartuşunun merkezine 30 µL RNase-free su eklenmiştir.
- Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir.
- RNA'yı membrandan toplama tüpüne elüsyon etmek için spin kartuşu 12,000 × g'de 2 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
- Elüsyon edilmiş RNA örneği aynı spin kartuşuna tekrar eklenmiş ve RNA örneğinin verimini artırmak için son 2 adım tekrarlanmıştır.
- Elüsyon edilmiş RNA'nın konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir.
- RNA'nın konsantrasyonu gruplara göre değişiklik göstermiştir.
- RNA, RNase-free tüplere her biri 1 µg RNA olacak şekilde alikotlanmıştır, bu RNA'nın tekrar dondurulup çözülmesini ve bozulmasını önler.
- RNA miktarı, bir Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre (Nanodrop Technologies Incorporated, USA) ile değerlendirilmiştir.
- Toplam RNA'nın kalitesi, Agilent Bioanalyzer 2100 sistemi (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) ve Agilent RNA 6000 Nanochip kitleri (Agilent Technologies) kullanılarak değerlendirilmiştir. Agilent tarafından sağlanan talimatlar takip edilmiştir.
- RNA saflaştırmasından hemen sonra cDNA işlemine devam edilmiştir veya alikotlar -80°C'de dondurulmuştur.

    - cDNA Sentezi

Ekstrakte edilen RNA, qPCR amplifikasyonu için cDNA'ya dönüştürülmüştür. Kontrol olarak, reaksiyon karışımına ters transkriptaz eklenmeden bir ters transkripsiyon kontrolü hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı (RT mix) Tablo 2.7'ye göre hazırlanmıştır. Önceki adımda elde edilen 1 µg RNA (10 µL hacminde) cDNA reaksiyonu için toplam hacim 20 µL olacak şekilde reaksiyon karışımı (Tablo 2.7) ile karıştırılmıştır.

Tablo 2.7 RT reaksiyon karışım bileşenleri

Bileşen	**Hacim (µL)**
10X RT Buffer	2.0
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8
10X RT Random Primers	2.0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0
Nuclease-free H2O	4.2
RNA (1 µg/10 µL)	10.0
Toplam Hacim	**20.0**

Yukarıdaki bileşenler uygun oranlarda karıştırılarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım, cDNA sentezi için kullanılmıştır.

cDNA RT Reaksiyonu Hazırlanması

- RT karışımı hazırlanmış, nazikçe karıştırılmış ve buz üzerinde bekletilmiştir.
- MicroAmp 8-tüplü şeride 10 µL RT ana karışımı pipetle eklenmiştir.
- Reaksiyon karışımına RNA örneği (1 µg) 10 µL eklenmiş ve birkaç kez yukarı-aşağı pipetleme ile karıştırılmıştır.

Notlar: Bir tüp, RNA girişini içermeli ancak Multiscribe™ Reverse Transcriptase içermemelidir. Bu tüp, genomik DNA'nın amplifiye edilmediğini doğrulamak için ters transkriptaz kontrolü (RTC) olarak kullanılmıştır.

- Tüpler kapatılmış ve içeriklerin dibe çökmesi ve hava kabarcıklarının giderilmesi için santrifüj edilmiştir.
- Tüpler buz üzerinde bekletilmiş ve ardından MiniAmp™ Termal Çevrim Cihazı'na yüklenmiştir.
- Ters transkripsiyon termal döngü koşulları (Tablo 2.8)

1. Reaksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlanmıştır.
2. Reaksiyon tüpleri termal çevrim cihazına yüklenmiştir.
3. Termal çevrim cihazı programı çalıştırılmıştır.

– Döngü tamamlandıktan sonra, 20 µL cDNA'ya 80 µL nükleaz içermeyen su eklenmiş, böylece 10 ng/µL çalışma konsantrasyonu elde edilmiştir ve cDNA -80°C'de saklanmıştır.
– Örnek, donma-çözülme döngülerinden ve cDNA'nın bozulmasından kaçınmak için bölünmüştür.

Tablo 2.8 cDNA reaksiyonunun termal çevrim koşulları.

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre (dak)
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	∞

- Primer Dizaynı

Primerler Thornton ve arkadaşlarının belirlediği protokole göre tasarlanmıştır [269]. Primer parametreleri şunlardır: Ürün boyutu: 80–120 bp, ürün erime sıcaklığı (Tm): 55–60°C, ikincil yapı ΔG: -3.5'ten fazla olmamalı ve GC yüzdesi: %35–80, optimal olarak %55. Primerler intron-spanning tarzda tasarlanmıştır, böylece ileri ve geri primerler aynı eksonda yer almamaktadır. Bu, genomik DNA kontaminasyonunu önleyebilir.

- qPCR Amplifikasyon Reaksiyonu

– 5 µM primer ve Tablo 2.9'da gösterilen reaktiflerle yapılmış master mix eklenmiş, toplam hacim 20 µL olmuştur.
– Plakaya eklemeden önce, reaksiyon karışımı iyice karıştırılmış ve hava kabarcıklarını önlemek için santrifüj edilmiştir.

- Reaksiyon karışımı eklerken plaka buz üzerinde tutulmuştur. Pipetleme hatalarını hesaba katmak için 1-2 ekstra reaksiyon hesaplanmıştır. Örneğin, 96 kuyucuklu plaka reaksiyonu için 98× reaksiyon karışımı hazırlanmıştır (Tablo 2.9).

Tablo 2.9 Çoklu kuyucuklu qPCR için reaksiyon karışımı

Bileşenler	**Hacim (her kuyucuk)**
SYBR Green master mix	10 µL
cDNA şablonu	10 ng
Nükleaz içermeyen su	değişken
Toplam reaksiyon karışımı	20 µL

- Reaksiyon karışımı eklendikten sonra, 96 kuyucuklu plaka MicroAmp Optik yapışkan film ile sıkıca kapatılmış ve hava kabarcıklarını gidermek ve tüm reaksiyon karışımını kuyucuk dibine getirmek için kısa süreliğine santrifüj edilmiştir.
- Gerçek zamanlı PCR amplifikasyon reaksiyonları, StepOnePlus™ Sistemi (Thermo Fisher Scientific) ile gerçekleştirilmiştir. β-actin geni, housekeeping gen olarak kullanılmıştır.
- Tüm reaksiyonlar, her cDNA örneği için triple olarak yürütülmüştür. Her gen için her deneyde bir şablon içermeyen kontrol (NTC) de dahil edilmiştir.
- Bu deney, her deney grubu hücre lizatı için seçilen genlerin tamamında bağımsız olarak iki kez tekrarlanmıştır.
- PCR çalışma protokolü, 10 dakikalık 95°C'de termal aktivasyon ve denaturasyon, ardından 45 döngü boyunca 95°C'de 10 saniye ve 59°C'de 10 saniye olarak ayarlanmıştır.
- Reaksiyonların spesifitesini belirlemek için 65 ile 95°C arasında sıcaklık artışı ile bir dissosiyasyon eğrisi oluşturulmuştur.

– Her reaksiyon için geçiş döngü sayısı (Cp), StepOnePlus™ Gerçek Zamanlı PCR Sistemi (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak otomatik olarak belirlenmiştir.
– Erime eğrisi analizi, kantitatif PCR (qPCR)'ın verimliliğini ve hassasiyetini doğrulamak için kullanılmıştır.
– Gen ekspresyon seviyeleri, 2-ΔΔCT yöntemi ile normalleştirilmiş değerler temel alınarak ölçülmüştür [270].

2.1.10.2 Protein Seviyesi Analizi: Western Blot Tekniği

Western blotlama, oksidatif stres tarafından indüklenen erken yaşlanmayla ilişkili protein düzeyi değişikliklerini doğrulamak için kullanılabilir temel bir tekniktir [271]. Protein örnekleri, Proteaz inhibitörü tek kullanımlık kokteyli ve fosfataz inhibitörü kokteyli içeren radyoimmünopresipitasyon lizis tamponunda hazırlanmıştır (78420-Thermo Fisher Scientific). Protein konsantrasyonları Qubit™ protein assay kitleri kullanılarak ölçülmüştür (Q33211-Invitrogen). Ardından, 60 µg protein LDS örnek tamponu ve bold reducing agent ile 70ºC'de 10 dakika inkübe edilmiştir. 60 µg protein örnekleri Bolt 4–12% bis-tris plus jel üzerinde yüklenmiştir (Thermo Fisher Scientific). Jel, 200 V'de 20 dakika çalıştırılmıştır (Tablo 2.10). Proteinler, iBlot 2 dry blotting sistemi kullanılarak nitroselüloz membrana transfer edilmiştir (Thermo Fisher Scientific). Birincil ve ikincil antikor reaksiyonları iBind flex western sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Membranlar, spesifik olmayan bağlanmayı engellemek için iBind flex çözeltisi (iBind Flex Buffer, iBind Flex Additive ve saf su) ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Birincil (p21, p16, pRB1 ve β-actin) ve ikincil (HRP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), HRP Goat Anti-Mouse IgG (H+L)) antikor reaksiyonları, üreticinin protokolüne göre oda sıcaklığında 2.5 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Protein-antikor kompleksleri, Pierce ECL western blotting substratı ile görselleştirilmiştir. İmmünreaktif protein bantları, bir GEN-BOX imagER Fx (Ankara, Türkiye) kullanılarak tespit edilmiştir. Reaksiyon aşamaları aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Takip edilen çalışma adımları aşağıda detaylandırılmıştır.

- Örneklerin Hazırlanması

İlk olarak örneklerin konsantrasyonları ayarlanmıştır.

$$(M1 \times V1) = (M2 \times V2) \quad (2.11)$$

M1= Çözeltinin ilk derişimi

M2= Çözeltinin son derişimi

V1= Çözeltinin ilk hacmi

V2= Çözeltinin son hacmi

Örnekler jel kuyusuna 60 µg konsamtrasyon olacak şekilde hesaplanarak (2.11) jelde yürütülmüştür.

Hesaplamadan sonra gerekli solüsyonlar:

Tablo 2.10 Western blot jel yükleme bir örnek için gerekli hesaplama

LDS Sample Buffer	2,5 µl
Sample Reducing Agent	1 µl
Örnek	Hesaplanan miktar ((µl)
Saf Su	6,5 (µl) - örnek (µl)
Toplam	10 µl

- İnkübasyon

– Hazırlanan tüpler 70 °C ‘de 10 dk inkübe edilmiştir.
– İnkübasyon sonunda buz üzerinde ya da +4 °C ‘de bir süre bekletilmiştir.

- Yürütme İşlemi

– Bolt ™% 4-12 Bis-Tris Plus Jel kullanıma hazırlanmıştır.
– Yürütme işlemi Running Buffer 1X solüsyonu ile gerçekleştirilmiştir.
– Birinci kuyucuğa marker konulmuştur.
– 200 voltta yaklaşık olarak 20-25 dk yürütme işlemi yapılmıştır.

- Membrana Transfer

– Transfer işlemi için Thermo Fisher Scientific IBlot 2 Dry Blotting System kulanılmıştır.

- Jel Transfer Edilme İşlemi

Jeli haznesinden çıkarmak için içi saf su dolu küvette sudan geçirilmiştir. Köşelerinden spatula ile kaldırılarak yavaşça üst kapak çıkarılmıştır. Dikkatlice ayrılmıştır.

- IBlot™ 2 Transfer Stacks İşlemi

– IBlot 2 cihazının kendine ait sandviç şeklindeki membran aktarım sistemi (IBlot™ 2 Transfer Stacks) kullanılarak 20 voltta 7'dk da jelden membrana aktarım işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfer işleminden sonra Blocking Solüsyonu hazırlanmıştır.

iBind™ Flex Solution Kitinden Blocking solüsyonu aşağıdaki hacimlerde hazırlanmıştır.

40 ml saf su + 10 ml 5X Buffer + 500 µl 100X Additive Solüsyonu

– Transfer işlemi bittikten sonra jel atılmıştır. Transfer kağıdındaki jel görüntüsü kesilerek alınmıştır. Hazırlanan Blocking solüsyonu içerisine koyulmuştur. 5 dk bekletilmiştir.

- Antikor Uygulama 1.Aşama İşlemi

– Antikor uygulama işlemi Invitrogen™ iBind™ Flex Western cihazında gerçekleştirilmiştir. Bunun için cihaz kit solüsyonları kullanılmıştır. Antikor, yıkama ve Blocking solüsyonları bu kimyasallardan hazırlanmıştır.

- Antikor Uygulama 2.Aşama İşlemi

– Blocking solüsyonundan 2'şer ml olmak üzere kaç tane antikor hazırlanacaksa o sayı kadar 2,5 ml 'lik tüplere ya da falcon tüplere konulmuştur. Vortexlenmiştir.
– iBind™ Flex kartı Blocking solüsyonu ile (10ml) ile ıslatılmıştır. Membranın konulacağı yere aynı solüsyondan 1ml daha konulmuştur. Membran karta yerleştirilirken ters konulmuştur. Silindirle üzerinden geçerek sabitlenmiştir.
– iBind™ Flex cihazında 3 saat bekletilmiştir.

– Sekonder antikora özgü substrat (ECL) solüsyonu aşağıda belirtilen hacimlerde hazırlanmıştır.

1 ml Luminol/Enhancer solüsyonu + 1 ml Peroksidaz solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır.

– iBind™ Flex'den çıkarılan membran solüsyona yatırılmıştır.

- Görüntüleme

– Görüntüleme işlemi için kemilüminesans görüntüleme sistemi kullanılmıştır. Bu görüntüleme sisteminin temeli kimyasal luminol olduğu için ECL solüsyonu kulanılmıştır. 1:1 hazırlanan ECL solüsyonunda karanlık ortamda 5 dk membran inkübe edilerek görüntüleme işlemine geçilmiştir.
– Genbox cihazında tablaya yerleştirilen membran görüntüleri GEN-BOX imagER Fx PC görüntüleme programı ile çekilmiştir.

- Protein Ölçümü

Qubit™ protein ve protein broad range (BR) assay test kiti ile protokole uygun şekilde ölçülmüştür (Cat: Q33211, İnvitrogen).

2.1.11 Bikinkoninik Asit (BCA) Protein Testi

BCA testi, bir numunedeki protein konsantrasyonunu tahmin etmek için yaygın olarak kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir [272]. BCA testi, reaktifin alkali koşullar altında oldukça kararlı olması ve bakır çözeltisine dahil edilebilmesinden dolayı tek adımlı bir prosedürle gerçekleştirilebilirliği açısından araştırmacılara avantaj sunmaktadır [273]. Bu yöntem BCA assay kit protokolüne göre çalışılmıştır.

– Bir dizi protein standardı hazırlamak için protokole uygun olarak seyreltme işlemleri yapılmıştır.
– Bir BSA Çözeltisi tüpünün içeriği, saf su kullanılarak temiz şişelerde seyreltilmiştir. Uygulanacak reaktif, 50'ye 1 oranında BCA Reaktifi A ile BCA Reaktifi B (50:1, Reaktif A) karıştırılarak hazırlanmış ve kullanımdan önce 30 dakika inkübe edilmiştir.
– Hazırlanan BSA standart çözeltisi ve protein numunesi 25'er µL hacimde alınıp 96 kuyucuklu mikroplakanın farklı kuyucuklarına aktarılmıştır.

- Her kuyucuğa 200 µL BCA çalışma reaktifi eklenmiş ve plaka hafifçe sallanmıştır.
- Plaka 30 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilip oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Sonrasında mikroplaka okuyucuda, 562 nm'de absorbans okumaları yapılmıştır.
- Konsantrasyonların absorbans değerleri kullanılarak standart bir eğri çizilmiştir. Bu standart eğri verileri ile hücre lizatlarının protein konsantrasyonu hesaplanmıştır.

2.2 In Vivo Materyal-Metod

2.2.1 In Vivo Çalışmalar

In vivo yaşlanma çalışmalarında D-galaktoz ile indüklenmiş hayvan modeli kullanılmıştır. İnsan ile aynı canlı sınıfında yer alması, yüksek anatomik ve fizyolojik benzerliğe sahip olması, yaşlanmanın oksidatif hasara bağlı olarak meydana gelmesi gibi etmenler değerlendirilerek bu çalışmada model deney hayvanı olarak sıçan kullanılması uygun görülmüştür [274, 275]. D-galaktoz uygulaması ile indüklenmiş yaşlanma modeli oluşturulan sıçanlarda; beyin dokusunda Şelidonik asit'in oksidatif hasara bağlı yaşlanma ile ortaya çıkan fenotipe karşı gösterdiği biyolojik etkinliği, davranış testi ile incelenmiştir.

2.2.1.1 Deney Hayvanlarının Gruplara Ayrılması ve Yaşlanma Modeli Oluşturulması

Çalışma için deney hayvanları; ÜSKÜDAB bünyesinde yer alan Üsküdar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etil Kurulu (ÜÜ-HADYEK) tarafından 08.03.2024 tarih ve 2024-02 sayılı karar ile etik kurul onayı alınmıştır (EK-A). Çalışmamızda 12 haftalık 32 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanılmıştır. Deney hayvanları tabloda gösterildiği gibi 4 gruba ayrılmış ve deney süresi 10 hafta olarak belirlenmiştir (Tablo 2.11). Bu doğrultuda 2. ve 4. gruplara 8 hafta boyunca 150 mg/kg subkutan (s.c.) enjeksiyon olarak D-gal (Sigma Aldrich) uygulanmıştır. 3. ve 4. gruplara ise 8 hafta boyunca 2 mg/kg oral gavaj yoluyla CA (Sigma Aldrich) verilmiştir. Kontrol grubuna ise benzer stres seviyesini uyugulamak için oral gavaj ile saf su verilmiştir.

Tablo 2.11 In Vivo Deney Grupları

Grup	**Etken Madde**	**Uygulanacak İşlem**
I	Kontrol Grubu	Bu gruba sadece oral olarak serum fizyolojik verilmiştir.
II	Yaşlanma Kontrol	Bu gruba 150 mg/kg D-galaktoz i.p. olarak verilmiş ve yaşlanma gelişimi ile sadece oral serum fizyolojik verilmiştir.
III	Şelidonik Asit	*İn vitro* sitotoksisite testine göre belirlenen dozda oral 2mg/kg Şelidonik asit verilmiştir.
IV	D-galaktoz + Şelidonik Asit	Bu gruba 150 mg/kg D-galaktoz i.p. olarak verilecek ve yaşlanma gelişimi ile *in-vitro* sitotoksisite testine göre belirlenen dozda oral 2mg/kg Şelidonik asit verilmiştir.

2.2.1.2 Sakrifikasyon İşlemi

10 hafta süren deney süresi sonunda, bir gece aç bırakılan sıçanlara eter ile uyutma işlemi uygulanmıştır. Genel anestezi sonrası perfüzyon tekniği kullanılarak fizyolojik enjeksiyon yapılmış ve dokular kandan arındırılmıştır. Daha sonra sıçanlar giyotin ile sakrifiye edilmiştir. Daha sonra yapıalcak çalışmalar için beyin dokuları alınmıştır. Biyokimyasal analizler için kullanılacak doku örnekleri, etiketleme işlemi sonrası azot gazı ile hızlı dondurma işlemi uygulanarak -80°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.1.3 Davranış Testi

- **Yeni Obje Tanıma Testi (NOR)**

Tanımaya dayalı hafıza ve bilişsel aktiviteyi skorlayan bir test olan Yeni Obje Tanıma (NOR) Testi iki aşamalı bir ölçümle kısa ve uzun süreli hafızayı ölçmek için yaygın bir biçimde kullanılmaktadır [276]. Bu test, ratlara tanıtılmış nesnelerden ziyada daha önce tanışmadıkları nesnelere eğilimlerine dayanır [277].

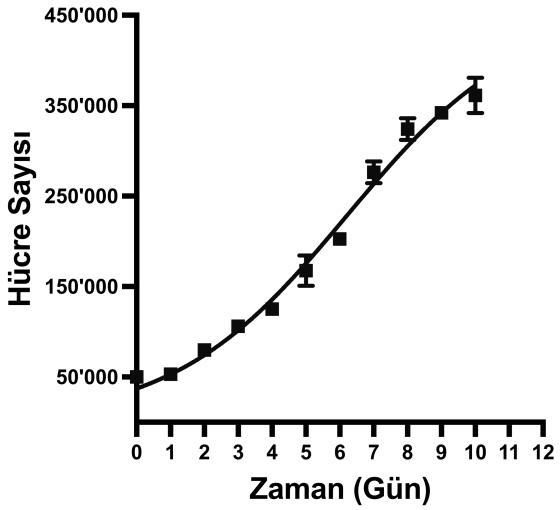
- Bu test, kamera ile izlenen bir kabinde gerçekleştirilmiştir.
- Alıştırma süresinde sıçanlara birbiriyle özdeş 2 nesneyi incelemek için 10 dakika süre verilmiştir.
- Ardından nesnelerden biri tamamen farklı bir nesneyle değiştirilip, sıçanların bu nesnelerle ilgilendikleri saniyeler 5 dakika boyunca kaydedilmiştir.
- Daha sonra yeni koyulan nesne tekrar farklı bir nesneyle değiştirilerek yine aynı şekilde ölçüm yapılmıştır.
- Elde edilen sonuçlar daha sonra ayrım ve tanıma indeksleri olarak hesaplanarak analiz edilmiştir [278].

3
BULGULAR

3.1 Oksidatif Stress Kaynaklı Erken Yaşlanma (SIPS) Modeli Geliştirilmesi

3.1.1 İkiye Katlanma Süresinin Hesaplanması

BJ fibroblast hücrelerinin zaman içinde nasıl değiştiğini incelemek için üstel büyüme modeli kullanılmıştır ve fibroblastların biyolojik büyüme özelliklerine çok yakın parametreler göstermiştir. Analiz sonuçlarına göre, ikiye katlanma süresi 3.86 gün olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1). Sonuç, American Type Culture Collection (ATCC CRL-2522, Manassas, VA, ABD) tarafından desteklenmiştir.

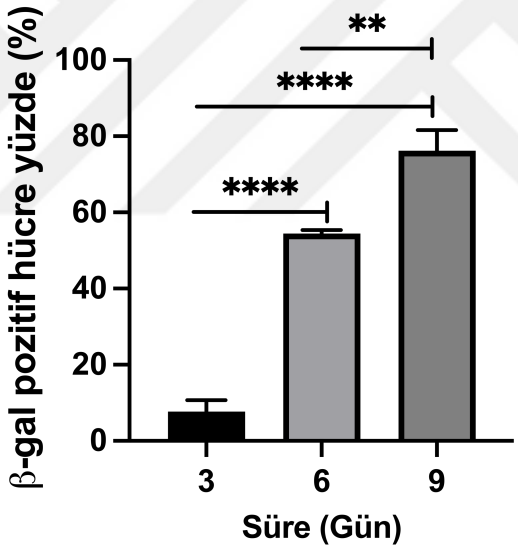


Şekil 3.1 Hücre sayısının ikiye katlanma süresi grafiği

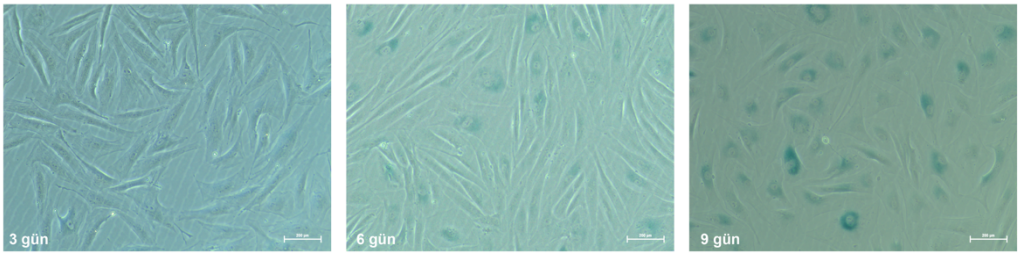
3.1.2 Senesens β-galaktozidaz Boyama

β-galaktozidaz pozitif hücrelerin (%) sayısı günler 3, 6 ve 9 için değerlendirilmiştir (Şekil 3.2 ve 3.3). Posthoc analiz, verilerin eşit ve varyansların homojen olduğu tek yönlü ANOVA sonucuna göre ($p > 0.05$) Tukey Testi ile gerçekleştirilmiştir.

Tukey’in çoklu karşılaştırma testleri, farklı zaman noktalarında gruplar arasında önemli farklılıklar göstermiştir. SA-β-Gal pozitif hücreler günler 3 (7.720 ± 2.99 %), 6 (54.43 ± 0.96 %) ve 9 (76.24 ± 5.35 %) olarak hesaplanmıştır. Gün 3 ile Gün 6 ($p < 0.0001$) ve Gün 3 ile Gün 9 arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı iken ($p < 0.0001$), Gün 6 ile Gün 9 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 0.001$, $p < 0.05$). Bu veri, gözlem süresi boyunca β-galaktozidaz-pozitif hücre sayısında zamana bağlı önemli bir artışı ve hücre popülasyonunun doğal yaşlanma sürecini yansıtmaktadır. Şekil 3.3’de gösterilen yaşlanma fenotipindeki belirgin zamana bağlı artış, ikiye katlanma süreleri ile tutarlıdır. Veri noktaları, üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama ± SEM'yi temsil etmektedir. Değerler, tek yönlü ANOVA ve Tukey’in post hoc testi ile GraphPad Prism yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir ve anlamlı farklılıklar belirtilmiştir (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001).



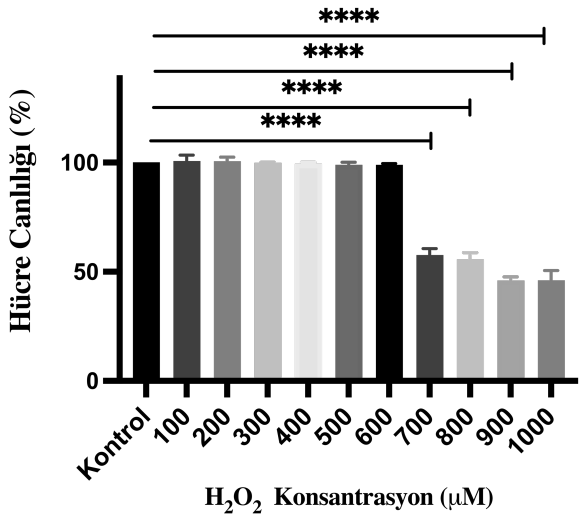
Şekil 3.2 Beta-galaktozidaz boyama kantifikasyonu % grafiği



Şekil 3.3 3, 6 ve 9. Gün temsili Beta-galaktosidaz boyama faz kontrast mikroskop analiz görselleri

3.1.3 Hidrojen Peroksit'in Oksidatif Stres Ajanı Subletal Doz Tayini

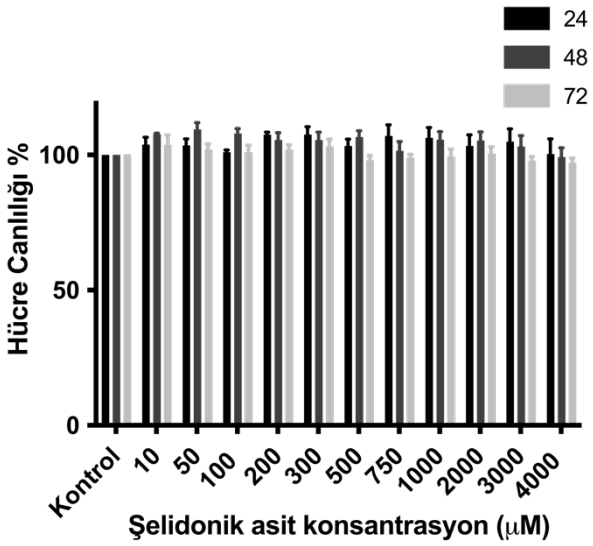
Oksidatif stres ajanı olarak H_2O_2'nin subletal dozunu belirlemek için, 100–1000 µM aralığındaki konsantrasyonlar MTT testi sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Posthoc analiz, verilerin eşit ve varyansların homojen olduğu tek yönlü ANOVA sonucuna göre ($p>0.05$) Tukey testi ile gerçekleştirilmiştir. Tukey'in test sonuçları, 100–600 µM H_2O_2'nin hücre canlılığı üzerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir etkisi olmadığını ve kontrol grubu ile 100–600 µM H_2O_2 konsantrasyon aralığı arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermiştir (tüm p-değerleri>0.9999, $p>0.05$). Ancak, 700–1000 µM H_2O_2 konsantrasyon aralığı hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir antiproliferatif etki göstermiştir ve kontrol grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.0001$) (Şekil 3.4). Hücre ölümüne yol açmadan oksidatif stres indükleme gereksinimi göz önüne alındığında, 200 µM H_2O_2 tedavi dozu olarak seçilmiştir, bu doz nekroz veya apoptoz yerine gerçek senesensi indükleyerek sonuçları etkileyebilir. Literatürden elde edilen veriler ve ön çalışma sonuçları, bu konsantrasyonun, hücre canlılığını korurken senesensi indüklemek için yeterli oksidatif stres sağlayan bir denge sunduğunu desteklemektedir [29]. 200 µM H_2O_2'nin seçilmesi, SIPS çalışmalarını kontrollü bir şekilde yapmaya olanak tanıyarak, Şelidonik asit'in yaşlanma yollarını düzenleme potansiyelini hücrelere aşırı sitotoksik etkiler yüklemeden incelemeyi kolaylaştırır. Veri noktaları, üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama ± SEM'yi temsil etmektedir. Değerler, tek yönlü ANOVA ve Tukey'in post hoc testi ile GraphPad Prism yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir ve anlamlı farklılıklar belirtilmiştir (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001).



Şekil 3.4 3 saat H_2O_2 uygulaması mtt testi sonuç grafiği

3.1.4 Şelidonik asit (CA) Subletal Doz Tayini

BJ hücre canlılığı üzerinde Şelidonik asit'in (CA) subletal doz aralığını belirlemek için, 10–4000 μM doz aralığı MTT testi ile değerlendirilmiştir. Posthoc analiz, verilerin eşit ve varyansların homojen olduğu tek yönlü ANOVA sonucuna göre ($p>0.05$) Tukey testi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda, 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan CA doz aralıkları ile kontrol arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). MTT testi sonuçları ve morfolojik analiz, 10-1000 μM CA doz aralığının BJ hücreleri üzerinde antiproliferatif etkiye sahip olmadığını göstermiştir (Şekil 3.5) [279]. CA'nın potansiyel etki aralığı ile hücre canlılığı arasındaki denge kriterine dayanarak, sonraki deneylerimiz için 250 μM ve 500 μM CA konsantrasyonları tedavi dozu olarak stratejik olarak belirlenmiştir. CA'nın hücresel yaşlanma üzerindeki uzun vadeli etkilerini in vitro değerlendirmek için CA tedavi süresi 72 saat olarak belirlenmiştir. In vitro hücresel yaşlanma üzerinde CA'nın uzun vadeli etkilerini değerlendirmek için bu süre uygun görülmüştür. Bu tedavi süresi, CA'nın hücresel senesensi uzun bir tedavi süresi boyunca düzenleme potansiyelini değerlendirmeye olanak tanımaktadır. Veri noktaları, üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama ± SEM'yi temsil etmektedir. Değerler, tek yönlü ANOVA ve Tukey'in post hoc testi ile GraphPad Prism yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir ve anlamlı farklılıklar belirtilmiştir (*$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$, ****$P<0.0001$).



Şekil 3.5 24, 48 ve 72 saat CA uygulaması hücre canlılığı MTT testi sonuçları grafiği

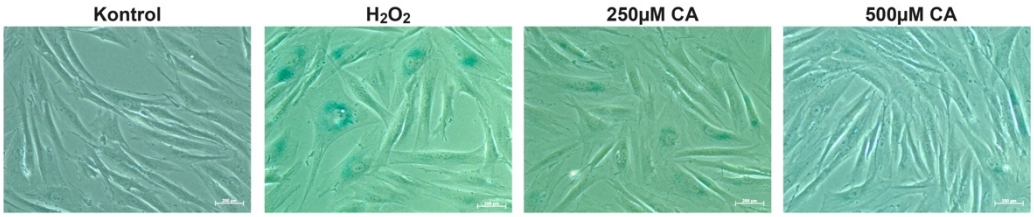
3.2 Serbest Radikal ve Antioksidan Aktivite Tayini

3.2.1 Senesens β-galaktozidaz Boyama

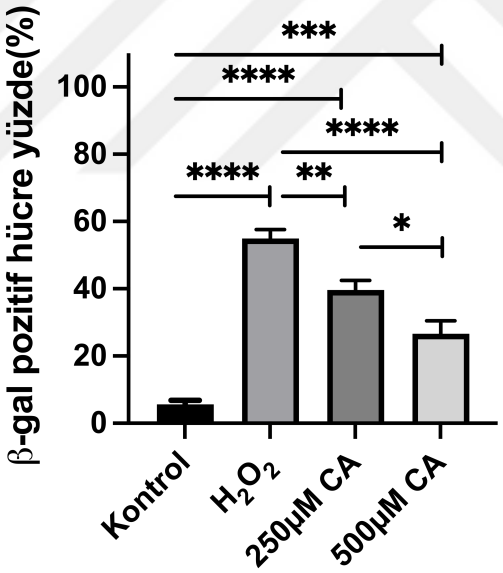
Şelidonik asit'in SIPS'de artan SA-βgal aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Posthoc analiz, verilerin eşit ve varyansların homojen olduğu tek yönlü ANOVA sonucuna ($p>0.05$) göre Tukey testi ile gerçekleştirilmiştir**.** Analiz sonucunda, kontrol (5.61±1.25) ve H_2O_2 grupları (54.92±2.64) arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.0001$). Kontrol grubu ile 250 µM CA (39.68±2.84) ve 500 µM CA (26.60±3.84) grupları arasındaki farklar da sırasıyla $p<0.0001$ ve $p=0.0004$ anlamlılık seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. H_2O_2 (54.92±2.64) ve 250 µM CA grupları (39.68±2.84) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken ($p=0.0070$, $p<0.05$), H_2O_2 ve 500 µM CA (26.60±3.840) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.0001$). Ayrıca, 250 µM CA (39.68±2.84) ve 500 µM CA (26.60±3.84) grupları arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0212$, $p<0.05$). H_2O_2 tedavi grubu, kontrol grubuna kıyasla pozitif SA-β-Gal hücrelerinin yüzdesini (54.92±2.64%) önemli ölçüde artırmıştır. Bu bulgu, SIPS indüksiyonunu göstermektedir (Şekil 3.6 ve 3.7). Sonuç olarak, 250 µM CA tedavisi (39.6±2.84%), pozitif SA-β-Gal hücrelerinin yüzdesini 27.76±2.84% azaltmıştır. Karşılaştırıldığında, 500 µM CA tedavisi (26.60 ±3.84%), H_2O_2 grubuna kıyasla pozitif SA-β-Gal hücrelerinin yüzdesini %51.57± 3.84% azaltmıştır (Şekil 3.6 ve

3.7). Bu sonuçlar, Şelidonik asit'in SA-βgal aktivitesini azaltan yolları düzenleyerek SASP belirteçlerine karşı potansiyel bir senomorfik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Veri noktaları, üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama ± SEM'yi temsil etmektedir. Değerler, tek yönlü ANOVA ve Tukey'in post hoc testi ile GraphPad Prism yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir ve anlamlı farklılıklar belirtilmiştir (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001).



Şekil 3.6 Temsili Beta-galaktozidaz boyama faz kontrast mikroskop analiz görselleri



Şekil 3.7 Beta-galaktozidaz boyama kantifikasyon % grafiği

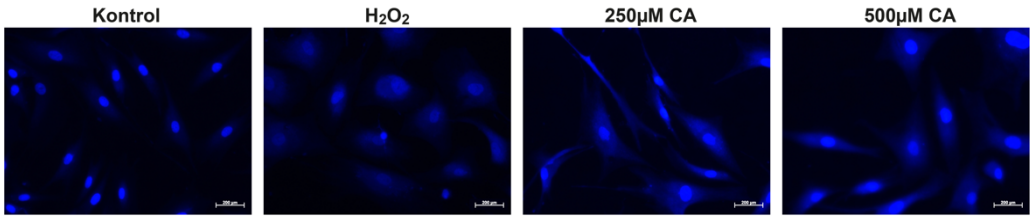
3.2.2 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-Akridin Orange (AO) Boyama

4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) boyama tekniği, CA'nın nükleer yaşlanma fenotipleri üzerindeki potansiyel azaltıcı etkilerini araştırmak için kullanılmıştır. DAPI ile boyanmış görüntüler FIJI/ImageJ v 2.14.0/1.54f kullanılarak analiz edilmiş ve nükleer alan-büyük ve küçük eksen oranları belirlenmiştir (Şekil 3.8 ve 3.9). Tek yönlü ANOVA sonuçlarına göre Posthoc Tukey testi yapılmıştır (p >

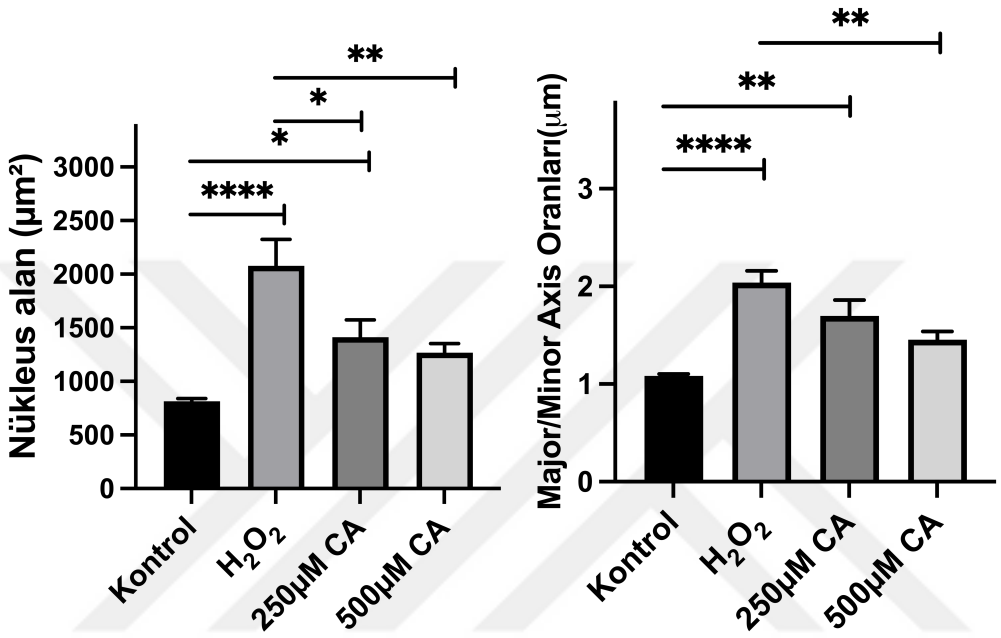
0.05). H_2O_2 ile muamele edilen grup, kontrol ve CA ile muamele edilen gruplara kıyasla daha büyük ve düzensiz nükleer yapılar sergilemiştir (Şekil 3.8 ve 3.9). Nükleer alan ve eksen oranları açısından kontrol ve H_2O_2 ile muamele edilen gruplar arasında $p < 0.0001$ anlamlılık düzeyinde önemli bir fark bulunmuştur; bu da yaşlanma nedeniyle meydana gelen önemli nükleer değişiklikleri göstermektedir. Benzer şekilde, kontrol ve 250 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında sırasıyla 0.0363 ve 0.0013 p-değerleri ile anlamlı bir fark gözlenmiş ve CA'nın bu yaşlanma ile ilişkili değişiklikleri hafifletme etkisi vurgulanmıştır. Ancak, kontrol ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında fark önemsizdir ($p = 0.1623$ ve $p = 0.0944$), bu da daha yüksek CA konsantrasyonunun nükleer morfolojiyi stabilize edebileceğini ve kontrol grubuna benzer sonuçlar gösterdiğini düşündürmektedir.

H_2O_2 ve 250 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında nükleer alan açısından önemli bir fark not edilmiş ($p = 0.0163$), ancak eksen oranlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p = 0.1382$, $p > 0.05$). Buna karşılık, H_2O_2 ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında iki parametrede de istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlenmiş ($p = 0.0023$), bu da CA'nın yaşlanmaya bağlı nükleer değişiklikleri tersine çevirme potansiyelini vurgulamaktadır. 250 µM ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında önemli bir fark gözlenmemiştir ($p = 0.9091$ ve $p = 0.4182$, $p > 0.05$), bu da her iki konsantrasyonun yaşlanma belirteçlerini benzer şekilde azaltmada etkili olduğunu göstermektedir.

Nükleer genişleme, hücresel yaşlanmanın bilinen bir özelliğidir. Bu, hücrenin bölünememe yeteneği ile ilişkilidir ve ayrıca DNA hasarı birikimi ve kromatin yeniden organizasyonunu yansıtır. CA tedavisi sonrası nükleer boyutun azalması ve nükleer morfolojinin onarılması, CA'nın bu yaşlanmaya bağlı nükleer değişikliklere karşı koyarak nükleer fonksiyonu ve hücresel homeostazı yeniden canlandırabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 3.8 Temsili DAPI floresan boyama faz kontrast mikroskop analiz görselleri

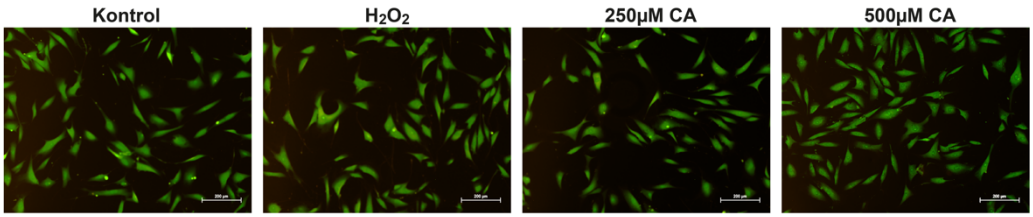


Şekil 3.9 Nükleer alanın DAPI boyama görüntülerinin kantitatif analizi

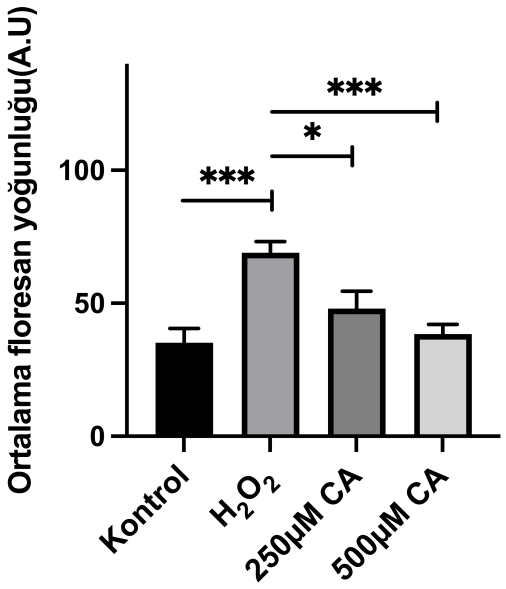
Öte yandan, akridin orange boyama (AO), yaşlanmanın önemli hücresel belirteçleri olan DNA hasarı ve lizozomal aktivite üzerindeki CA etkilerini araştırmak için kullanılmıştır. AO ile boyanmış görüntüler FIJI/ImageJ kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 3.10 ve 3.11). Tek yönlü ANOVA sonuçlarına göre Posthoc Tukey testi uygulanmıştır ($p > 0.05$). H_2O_2 ile muamele edilen gruptaki kırmızı floresan yoğunluğu, kontrol grubuna göre önemli ölçüde artmış ($p = 0.0001$) olup, bu da oksidatif stresin ve ilişkili yaşlanma fenotipinin indüklendiğini göstermektedir. Kontrol grubu ile 250 µM CA ile muamele edilen gruplar ($p = 0.2851$) ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar ($p = 0.9675$) arasında kırmızı floresan yoğunluğunda anlamlı bir fark gözlenmemiştir, bu da CA tedavisinin kontrol grubuna benzer sonuçlar gösterdiğini göstermektedir. Buna karşılık, 250 µM CA ile muamele edilen gruptaki kırmızı floresan yoğunluğu, H_2O_2 ile muamele edilen gruba göre önemli ölçüde azalmış ($p = 0.0262$), aynı zamanda 500 µM CA ile muamele edilen grupta daha belirgin bir azalma gözlenmiştir ($p = 0.0006$). 250 µM

ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p = 0.5384$), bu da her iki konsantrasyonun da H_2O_2'nin lizozomal aktiviteyi ve DNA hasarını artırma etkisini etkili bir şekilde azalttığını göstermektedir. AO ile boyanmış hücrelerdeki kırmızı floresansın nicel analizi, tedavi edilen ve kontrol grupları arasında RNA ve tek iplikli DNA içeriğinde önemli farklılıklar ortaya koymaktadır. Bu sonuç, tedavilere karşı hücresel tepkilerin, apoptoz ve otofaji gibi süreçler dahil olmak üzere, güvenilir bir ölçüsünü sağlar. CA ile tedavi edilen hücrelerde kırmızı floresan azalması, yaşlanma ile ilişkili SASP belirteci olan lizozomal aktivitenin azaldığını göstermektedir. Lizozomal aktivitenin yaşlanmış hücrelerde artması, hücresel bileşenlerin parçalanmasının bir parçasıdır ve aşırı aktivite, yaşlanmanın karakteristik özelliği olan pro-inflamatuar ortama katkıda bulunabilir. CA tedavisi sonrası gözlenen lizozomal aktivitedeki azalma, CA'nın SASP'yi hafifletebileceğini ve daha dengeli bir hücresel ortamı yeniden sağlayarak BJ fibroblastlarında yaşlanma fenotipine karşı koyabileceğini düşündürmektedir (Şekil 3.10 ve 3.11).

Veri noktaları, üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama ± SEM'yi temsil etmektedir. Değerler, tek yönlü ANOVA ve Tukey'in posthoc testi ile GraphPad Prism yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir ve anlamlı farklılıklar belirtilmiştir (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001).



Şekil 3.10 Temsili akridin orange boyama faz kontrast mikroskop analiz görselleri



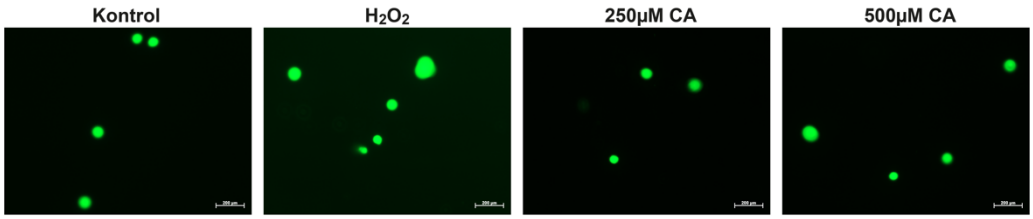
Şekil 3.11 Akridin orange boyasıyla boyanmış hücrelerde lizozomal aktivite kırmızı floresans kantitatif analizi

3.2.3 Genotoksisite Analizi: Comet Testi

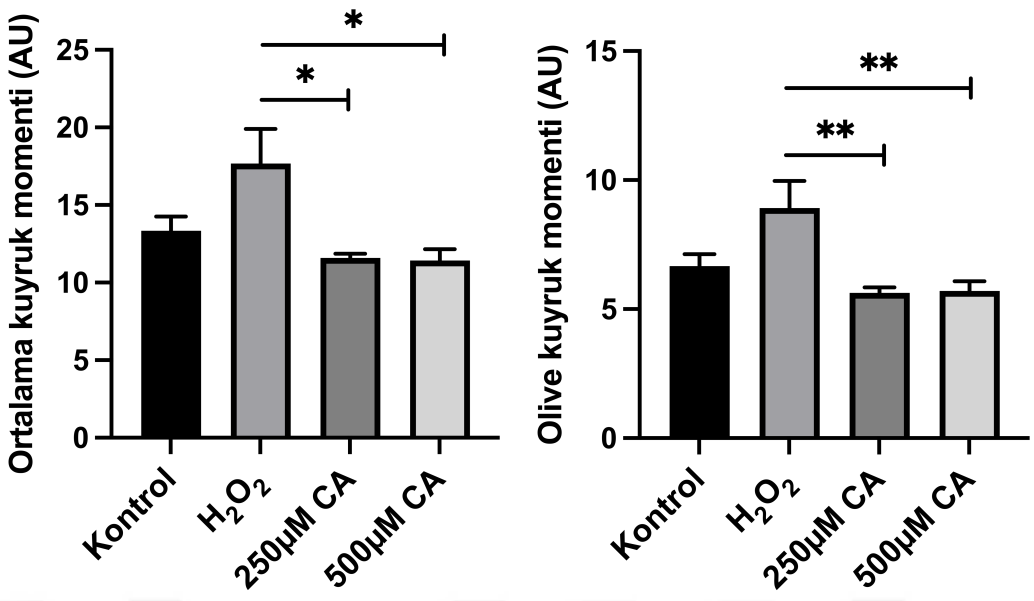
Şelidonik asit'in SIPS ile ilişkili DNA hasar onarımındaki potansiyel rolü araştırılmıştır. Bulgular, floresanla boyanmış kuyruk görüntüleri kullanılarak iki kritik parametreyi içerecek şekilde sunulmuştur: Olive tail moment ve extent tail moment. Posthoc analiz, verilerin eşit ve varyansların homojen olduğu tek yönlü ANOVA sonucuna ($p>0.05$) göre Tukey testi ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre olive tail moment ve extent tail moment için p değerleri sırasıyla verilmiştir (Şekil 3.12 ve 3.13). Kontrol ve H_2O_2 ile muamele edilmiş gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p=0.0756$, $p=0.1069$). Kontrol ve 250µM CA ile muamele edilmiş hücreler arasındaki karşılaştırma istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir ($p=0.6337$, $p=0.7654$). Benzer şekilde, kontrol ve 500µM CA ile muamele edilmiş hücreler arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p=0.6911$, $p=0.7119$). H_2O_2 ile muamele edilmiş ve 250µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasındaki olive tail moment farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0058$, $p=0.0143$). H_2O_2 ile muamele edilmiş ve 500µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0.0072$, $p=0.0116$). 250µM ve 500µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasındaki karşılaştırma istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir ($p = 0.9997$).

İstatistiksel analiz, H_2O_2 ile muamele edilmiş ve CA ile muamele edilmiş gruplar arasındaki DNA hasarında önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymaktadır. Hem 250µM hem de 500µM CA konsantrasyonları DNA hasarını önemli ölçüde azaltmaktadır. Bununla birlikte, iki CA konsantrasyonu arasındaki potansiyel etkilerde önemli bir fark bulunmamaktadır. Ancak, CA ile muamele edilen grup, H_2O_2 grubuna kıyasla minimal doz bağımlı DNA hasar birikimi sergilemiştir (Şekil 3.12 ve 3.13). Bu bulgu, CA'nın SIPS tarafından neden olan DNA hasarını onarmada gerekli olabileceğini önermektedir.

Veri noktaları, üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama ± SEM'yi temsil etmektedir. Değerler, tek yönlü ANOVA ve Tukey'in posthoc testi ile GraphPad Prism yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir ve anlamlı farklılıklar belirtilmiştir (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001).



Şekil 3.12 Temsili Comet testi floresans mikroskop analizi görselleri



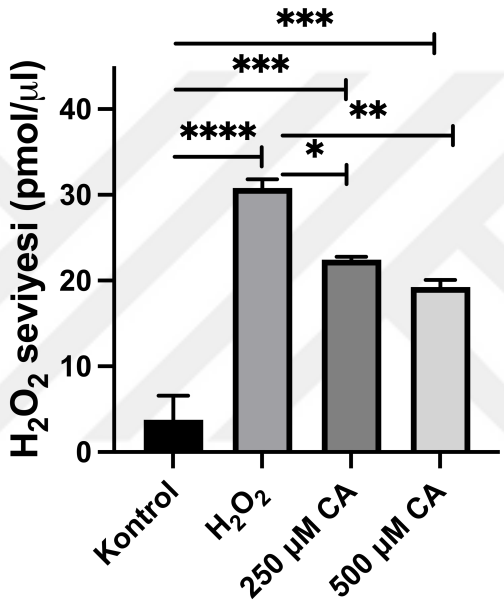
Şekil 3.13 Comet testi kantitatif analizi

3.2.4 Hidrojen Peroksit Seviyesi Ölçüm Sonuçları

Şelidonik asit'in H_2O_2 ile tedavi edilen hücrelerde ROS üretimi ve antioksidan aktivite üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Tek yönlü ANOVA sonucuna göre posthoc analiz Tukey testi ile yapılmıştır ($p > 0.05$). Analiz sonucunda, kontrol grubu (3.78 ± 2.78) ile H_2O_2 grupları (30.82 ± 0.98) arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.0001$). H_2O_2 gruplarında hücre içi H_2O_2 seviyelerinde kontrol grubuna göre önemli bir artış gözlenmiş, bu da oksidatif stresin etkili bir şekilde indüklendiğini göstermektedir. Kontrol grubu ile 250 µM CA (22.44 ± 0.33) ve 500 µM CA grupları (19.26 ± 0.80) arasındaki fark da sırasıyla 0.0001 ve 0.0005 anlamlılık seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. H_2O_2 (30.82 ± 0.98) ve 250 µM CA grupları (22.44 ± 0.33) arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p = 0.0205$) ve H_2O_2 ile 500 µM CA grupları (19.26 ± 0.80) arasındaki farkın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p = 0.0032$). Bulgularımız, CA tedavisinin artan H_2O_2 seviyelerinde doza bağlı bir azalmaya yol açtığını ortaya koymuştur (Şekil 3.14). CA'nın ROS seviyelerini doza bağlı bir şekilde azaltma yeteneği, oksidatif strese bağlı hasarı hafifletme konusunda potansiyel bir terapötik ajan olduğunu vurgulamaktadır, ki bu, hücresel yaşlanmada önemli bir faktördür. Karşılaştırıldığında, 250 µM CA (22.44 ± 0.33) ile 500 µM CA (19.26 ± 0.80) arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p = 0.5025$, $p > 0.05$). CA, hücre içi ROS'u

azaltarak hücresel bütünlüğü ve fonksiyonu korumaya yardımcı olabilir, yaşlanmaya bağlı disfonksiyonların başlamasını geciktirebilir. Bu sonuçlar, oksidatif stres ve yaşlanma ile ilişkili durumların yönetiminde CA'nın terapötik vaatlerini vurgulamaktadır. Sonuçlar kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve pmol/µL cinsinden sunulmuştur.

Veri noktaları, üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama ± SEM'yi temsil etmektedir. Değerler, tek yönlü ANOVA ve Tukey'in posthoc testi ile GraphPad Prism yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir ve anlamlı farklılıklar belirtilmiştir (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001).



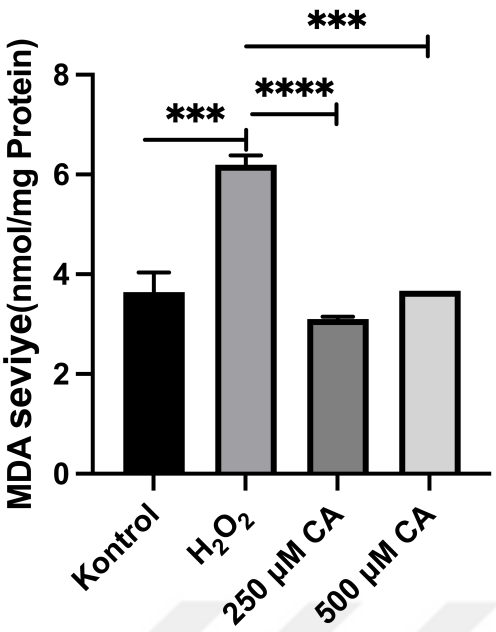
Şekil 3.14 H_2O_2 seviyesi ölçümü grafiği

3.2.5 Malondialdehit Miktar Tayini Sonuçları

Malondialdehit düzey analizleri için TBARS seviyeleri, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi ve oksidatif stres ile hücresel hasarın bir belirteci olarak incelenmiştir. Tek yönlü ANOVA sonucuna göre posthoc analiz Tukey testi ile yapılmıştır ($p > 0.05$). Analiz sonucunda, kontrol grubu (3.64 ± 0.39) ile H_2O_2 ile tedavi edilen gruplar (6.19 ± 0.18) arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p = 0.0002$). H_2O_2 tedavisi, kontrol grubuna kıyasla hücre içi TBARS seviyelerinde bir artışa yol açmıştır. Kontrol grubu ile 250 µM CA (3.10 ± 0.04) ve 500 µM CA (3.67 ± 0.00) ile tedavi edilen gruplar arasında sırasıyla 0.3572 ve 0.9998 anlamlılık seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). H_2O_2 (6.19 ± 0.18) ve 250 µM CA ile tedavi edilen

gruplar (3.10 ± 0.04) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.0001$). H_2O_2 (6.19 ± 0.18) ile 500 μM CA ile tedavi edilen gruplar (3.67 ± 0.00) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p = 0.0002$). CA tedavisi, TBARS seviyesini önemli ölçüde azaltmıştır. CA tedavisinin ardından TBARS seviyelerindeki azalma, CA'nın lipid peroksidasyonuna karşı etkili bir şekilde mücadele ettiğini ve bunun oksidatif stresle ilişkili hücresel hasarın, yaşlanma da dahil olmak üzere, gelişiminde kritik bir süreç olduğunu göstermektedir (Şekil 3.15). 250 μM CA (3.10 ± 0.04) ile 500 μM CA tedavi grupları (3.67 ± 0.00) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0.3238$, $p > 0.05$). CA, hücresel lipitleri peroksidatif hasardan koruyarak hücresel bütünlüğün ve işlevin korunmasına yardımcı olabilir ve potansiyel olarak yaşlanmaya bağlı disfonksiyonların başlamasını geciktirebilir. Bu bulgular, CA'nın yaşlanma ve buna bağlı hücresel bozulmaların yönetiminde terapötik bir ajan olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

Veri noktaları, üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama ± SEM'yi temsil etmektedir. Değerler, tek yönlü ANOVA ve Tukey'in posthoc testi ile GraphPad Prism yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir ve anlamlı farklılıklar belirtilmiştir (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001).

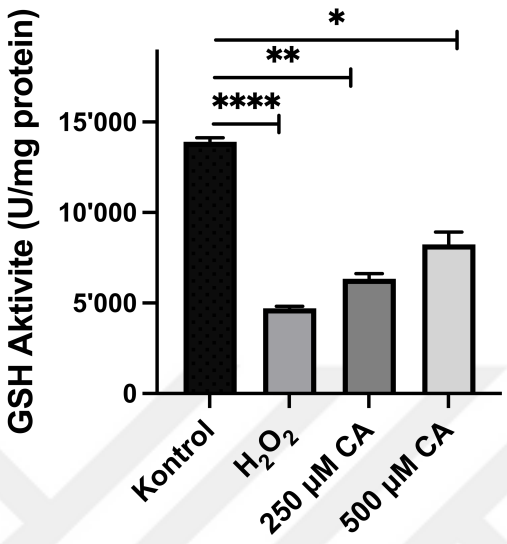


Şekil 3.15 MDA seviyesi ölçümü grafiği

3.2.6 Glutatyon Peroksidaz Aktivite Tayini Sonuçları

Şelidonik asit tedavilerinin GSH-Px aktivitesi üzerindeki etkisi de değerlendirilmiştir. Posthoc analiz, verilerin eşit ve varyansların tek yönlü ANOVA sonuçlarına göre homojen olması nedeniyle Tukey testi ile yapılmıştır ($p>0.05$). Analiz sonucunda, kontrol (13912±217) ile H_2O_2 grupları (4712±104) arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.0001$). Bu sonuç, H_2O_2 ile tedavi edilen grupta kontrol grubuna göre GSH-Px aktivitesinin azaldığını ve bunun da bozulmuş bir antioksidan savunma sistemini yansıttığını göstermektedir. Kontrol grubu ile 250 µM CA (6334±299) ve 500 µM CA (8241±681) arasında da sırasıyla 0.0060 ve 0.0410 anlamlılık seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). H_2O_2 grubu (4712±104) ile 250 µM CA (6334±299) ve 500 µM CA (8241±681) grupları arasındaki fark sırasıyla istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.0806$, $p=0.0878$, $p>0.05$). Ancak CA tedavisinin GSH-Px aktivitesini geri kazandırdığı gözlemlenmiştir. 250 µM CA ile 500 µM CA arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.0946$, $p>0.05$). H_2O_2 ile muamele edilen gruplarda GSH aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı gözlenmiştir. GSH aktivitesindeki azalma, hücrelerde zayıflamış antioksidan savunmayı önermektedir. Ancak, CA uygulanması GSH aktivitesini önemli ölçüde iyileştirmiş ve seviyesini tedavi edilmeyen kontrol grubuna benzer hale getirmiştir. Özellikle, GSH aktivitesinin iyileşmesi doz bağımlı olmuştur (Şekil 3.16).

Veri noktaları, üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama ± SEM'yi temsil etmektedir. Değerler, tek yönlü ANOVA ve Tukey'in posthoc testi ile GraphPad Prism yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir ve anlamlı farklılıklar belirtilmiştir (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001).



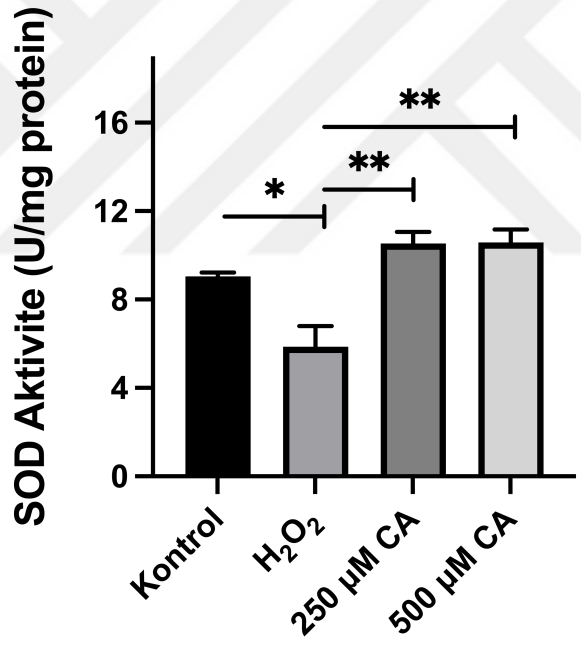
Şekil 3.16 GSH seviyesi ölçümü grafiği

3.2.7 Süperoksit Dismütaz Aktivite Tayini Sonuçları

Bu çalışmada, Şelidonik asit tedavisinin antioksidan sistem üzerindeki etkisi, özellikle SOD aktivitesi ölçülerek araştırılmıştır. Posthoc analiz, verilerin eşit ve varyansların tek yönlü ANOVA sonuçlarına göre homojen olması nedeniyle Tukey testi ile yapılmıştır ($p>0.05$). Analiz sonucunda, kontrol grubu (9.04±0.16) ile H_2O_2 grubu (5.86±0.92) arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p=0.0263$, $p<0.05$). Kontrol grubu ile 250 µM CA (10.53±0.53) ve 500 µM (10.58±0.57) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla $p=0.3765$ ve $p=0.3521$, $p>0.05$). Bu da CA ile tedavi edilen grupların kontrol grubuna benzer sonuçlar gösterdiğini düşündürmektedir. H_2O_2 (5.86±0.92) ile 250 µM CA (10.53±0.53) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p=0.0029$, $p<0.05$) ve H_2O_2 (5.86±0.92) ile 500 µM CA (10.58±0.57) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p=0.0028$, $p<0.05$) bulunmuştur. CA tedavisinin ardından SOD aktivitesindeki bu artış, CA'nın hücrenin antioksidan savunma mekanizmalarını geliştirdiğini göstermiştir ve bu da oksidatif stres ve ilgili hücresel hasarı azaltmanın bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Karşılaştırmada, 250 µM CA (10.53±0.53) ve 500 µM CA (10.58±0.57) arasındaki fark istatistiksel olarak

anlamlı bulunmamıştır (p=0.9999, p>0.05). Ana bulguları tekrarlamak gerekirse, H_2O_2 ile muamele edilen grupta SOD aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla bir azalma gözlenmiştir. Buna karşılık, CA tedavisi SOD aktivitesini önemli ölçüde artırmış ve yanıtlar kontrol grubundan daha yüksek olmuştur (Şekil 3.17). Ancak, CA uygulama konsantrasyonlarının SOD aktivitesi üzerindeki etkisi analiz edildiğinde, konsantrasyonlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu bulgular, CA'nın hücresel sağlığı korumak ve yaşlanmaya bağlı disfonksiyonların başlamasını önlemek için terapötik bir ajan olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

Veri noktaları, üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama ± SEM'yi temsil etmektedir. Değerler, tek yönlü ANOVA ve Tukey'in posthoc testi ile GraphPad Prism yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir ve anlamlı farklılıklar belirtilmiştir (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001).



Şekil 3.17 SOD seviyesi ölçümü grafiği

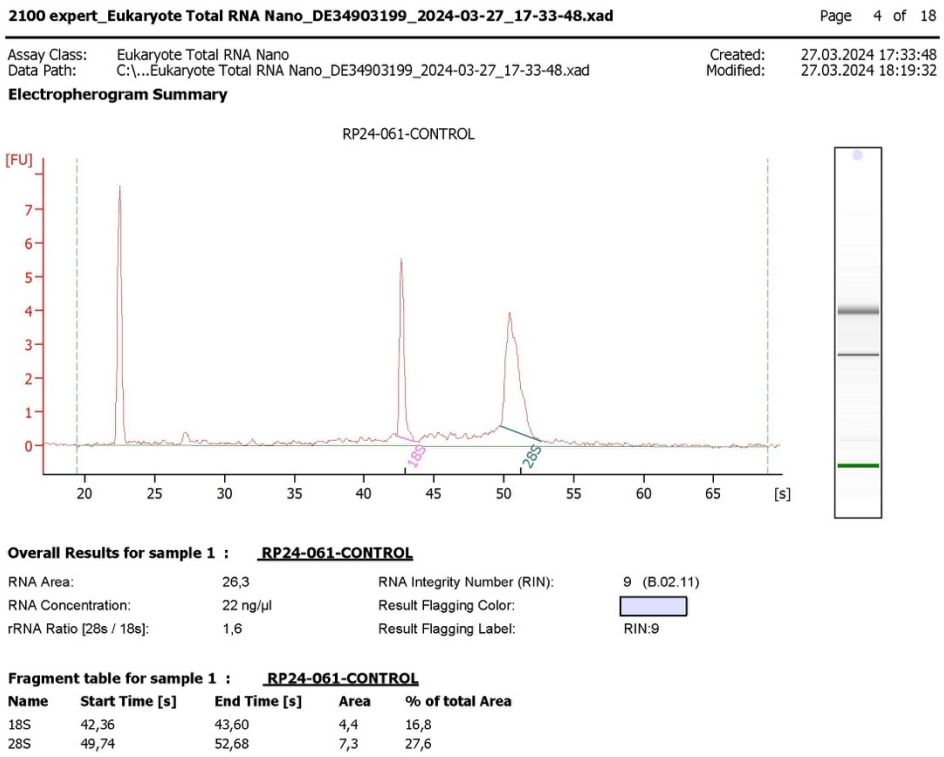
3.3 Gen Ekspresyon ve Protein Analiz Sonuçları

3.3.1 RT PCR Sonuçları

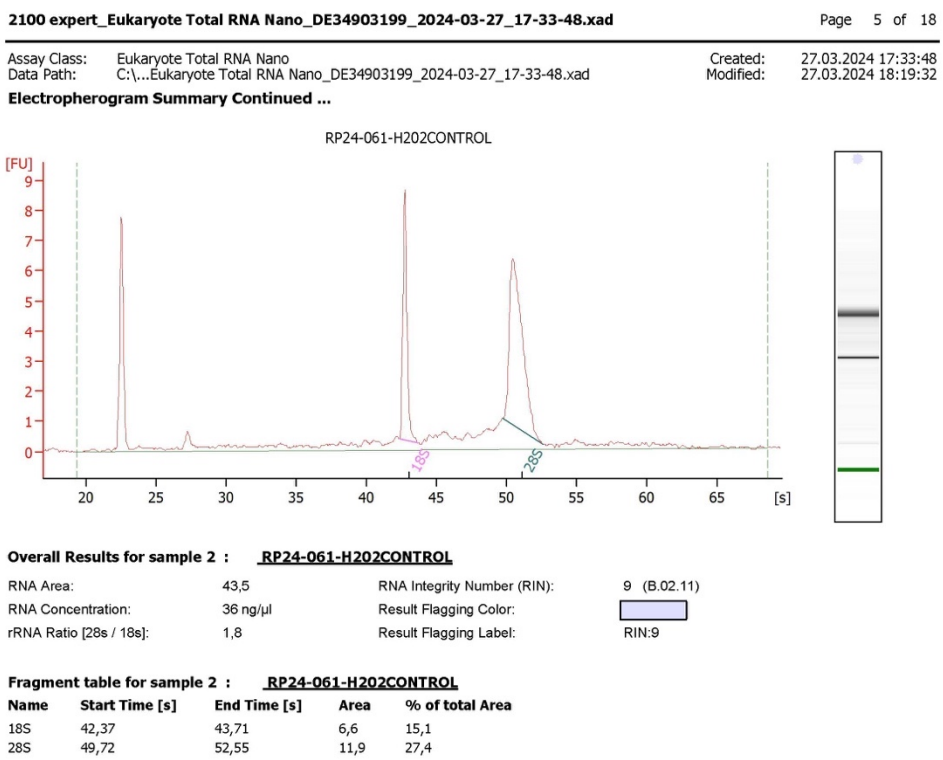
3.3.1.1 Total RNA İzolasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tüm RNA örneklerinin saflığı, OD260/280 ve OD260/230 absorbans oranları kullanılarak değerlendirilmiştir. Protein kontaminasyonuna işaret eden OD260/280 oranı 1.8–2.0 arasında ve organik kirleticilere işaret eden OD260/230 oranı 2.0'dan

yüksek olan RNA örnekleri ileri analizler için kullanılmıştır. RNA örneklerinin saflığı ve bütünlüğü değerlendirilmiş ve BJ fibroblast hücreleri Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) kullanılarak elde edilmiştir. Yazılım ve algoritma, total RNA'yı 1'den 10'a kadar bir ölçekle sınıflandırır; burada 1 en fazla bozunmuş RNA profilini, 10 ise en sağlam RNA profilini temsil eder [280]. RNA kalitesi RNA bütünlük skoru (RIN) ile değerlendirilmiştir. Tüm grupların RIN değerleri 8.9 ile 9.2 arasında olmuştur (Şekil 3.18, 3.19, 3.20, 3.21).



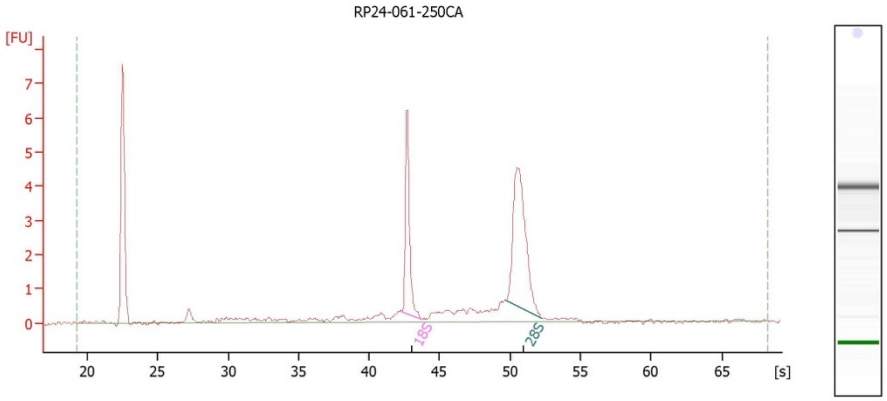
Şekil 3.18 Kontrol grubu total rna bütünlük numarası



Şekil 3.19 H_2O_2 grubu total rna bütünlük numarası

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE34903199_2024-03-27_17-33-48.xad
Created: 27.03.2024 17:33:48
Modified: 27.03.2024 18:19:32

Electropherogram Summary Continued ...



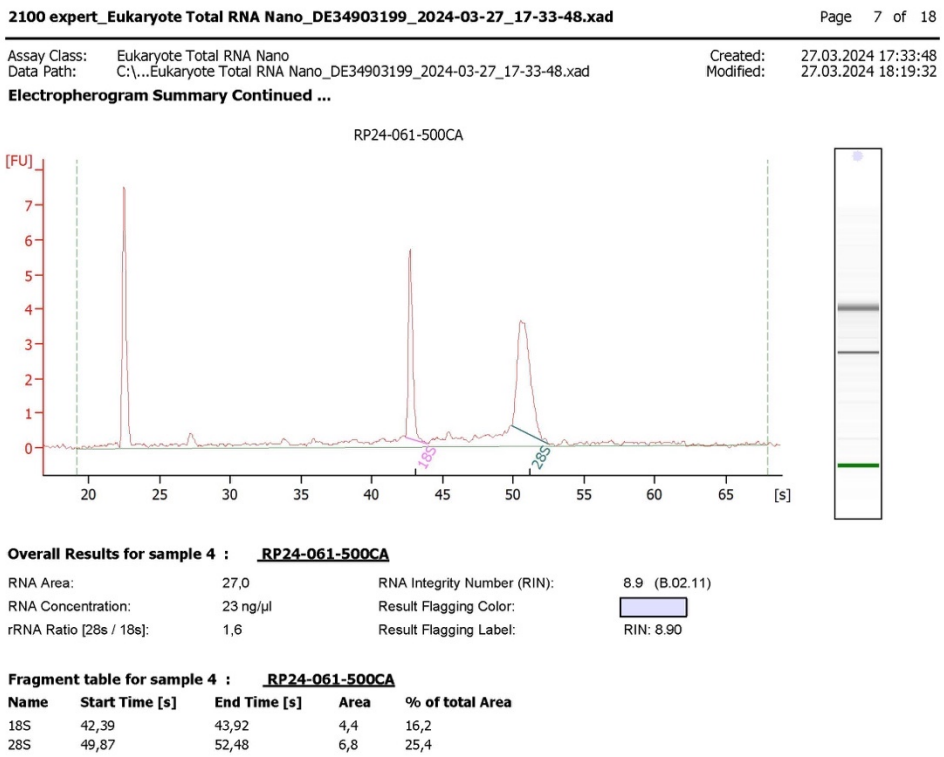
Overall Results for sample 3 : RP24-061-250CA

RNA Area:	25,8	RNA Integrity Number (RIN):	9.2 (B.02.11)
RNA Concentration:	22 ng/µl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1,7	Result Flagging Label:	RIN: 9.20

Fragment table for sample 3 : RP24-061-250CA

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	42,33	43,71	4,9	18,9
28S	49,70	52,22	8,3	32,1

Şekil 3.20 250 µM CA grubu total rna bütünlük numarası



Şekil 3.21 500 µM CA grubu total rna bütünlük numarası

3.3.1.2 Aday Referans Genlerin Seçimi ve Amplifikasyon Spesifikliği, PCR Verimliliği ve Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Stresle indüklenen prematüre yaşlanma belirteçlerini tanımlamak için, 11 gen senesens ile ilgili veri sonuçlarına dayanarak potansiyel hedef genler olarak seçilmiştir. Tüm gen primer dizileri Tablo 3.1'de detaylandırılmıştır. RT-qPCR primerlerinin spesifikliği, spesifik kantitatif analizler sağlamak için erime eğrisi analizleri kullanılarak doğrulanmıştır. Farklı koşullar altında bu bulguların tutarlılığı, CA'nın SIPS üzerindeki potansiyel senolitik ve senomorfik etkilerini değerlendirmek için seçilen hedef ve referans genlerin doğruluğunu ve hassasiyetini göstermektedir.

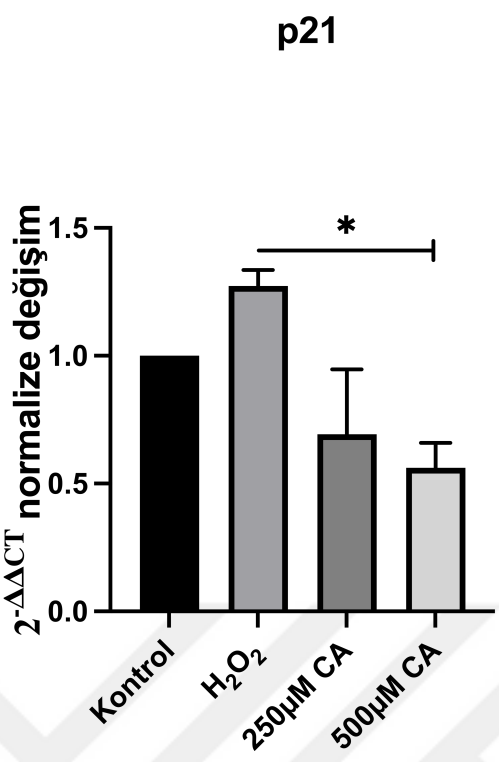
Çevrim eşiği (Ct) değerleri, RT-qPCR'da floresan sinyalinin algılama eşiğini aşması için gerekli çevrim sayısını belirlemek için kantitatif bir ölçü olarak hizmet eder; numunedeki hedef nükleik asit miktarını yansıtır [281]. Seçilen 12 potansiyel hedef ve referans genin ekspresyon düzeyleri bu Ct değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. Bu referans genlerin Ct değerleri 15.3 ile 34.7 arasında değişmiştir. β-Actin, adaylar arasında en yüksek ekspresyonu gösteren gen olarak

tanımlanmıştır; en düşük Ct değerine sahip olmuştur. Bu bulgu, erken senesens ile ilişkili gen ekspresyon değişikliklerini normalize etmek ve değerlendirmek için referans gen olarak β-Actin'in dayanıklılığını ve potansiyel kullanımını vurgulamaktadır.

Bu analiz, tek yönlü ANOVA ve ardından post hoc Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile sırasıyla SIPS sonrası CA tedavisi uygulanmış gruplarda tüm gen ekspresyonlarının istatistiksel önemini özetlemiştir.

- p21 Gen Ekspresyon Seviyesi

Bu analiz, p21 gen ekspresyonu ile ilgili istatistiksel verileri ortaya koymuştur. Kontrol ve H_2O_2 ile muamele edilen gruplar arasında p21 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.5447$). Kontrol ve 250 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p = 0.4533$). Benzer şekilde, kontrol ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.1989$). H_2O_2 ile muamele edilen ve 250 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında fark anlamlı olmamakla birlikte ($p = 0.0733$), H_2O_2 ile muamele edilen ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p = 0.0290$). Bu durum, daha yüksek konsantrasyonlarda CA'nın, yaşlanma yolunun önemli bir düzenleyicisi olan p21'in oksidatif stres kaynaklı yukarı regülasyonunu kısmen engelleyebileceğini göstermektedir. 250 µM ve 500 µM CA ile muamele edilen hücreler arasındaki karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemesine rağmen ($p = 0.9085$), bu bulgu CA'nın yaşlanma belirteçlerini modüle etmede doz bağımlı bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, CA'nın oksidatif stres kaynaklı erken yaşlanmaya karşı koruyucu bir rol oynayabileceğini, özellikle p53-p21 yolunu modüle ederek hücresel yaşlanmanın ve ilgili patolojilerin yönetiminde potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini ima etmektedir. (Şekil 3.22).

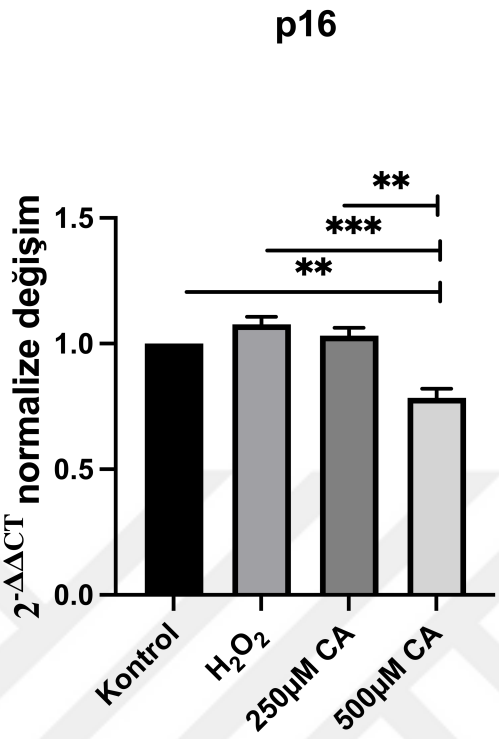


Şekil 3.22 p21 gen ekspresyonu analiz grafiği

- p16 Gen Ekspresyon Seviyesi

Bu analiz, p16 gen ekspresyonuna ilişkin istatistiksel verileri ortaya koymuştur. Kontrol ve H_2O_2 ile muamele edilen gruplar arasında p16 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.2838$). Kontrol ve 250 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p = 0.8562$). Veriler, hafif ancak biyolojik olarak anlamlı olabilecek ekspresyon değişimlerini işaret etmektedir. Kontrol ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p = 0.0028$). H_2O_2 ile muamele edilen ve 250 µM CA ile muamele edilen gruplar arasındaki fark anlamlı olmamıştır ($p = 0.6707$). H_2O_2 ile muamele edilen ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p = 0.0004$). p16, siklin bağımlı kinazları inhibe ederek ve hücre döngüsünü durdurarak tümör baskılayıcı işlev gören kritik bir hücre döngüsü düzenleyicisidir. Bu aşağı regülasyon, daha yüksek CA konsantrasyonlarının p16 yolunu etkileyebileceğini ve oksidatif strese yanıt olarak hücrenin yaşlanma durumuna girme eğilimini azaltabileceğini göstermektedir. 250 µM ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasındaki karşılaştırma, istatistiksel olarak anlamlı bir

fark göstermiştir (p = 0.0012) ve bu, CA'nın bu önemli yaşlanma belirteci üzerinde doz bağımlı etkisini vurgulamaktadır (Şekil 3.23).

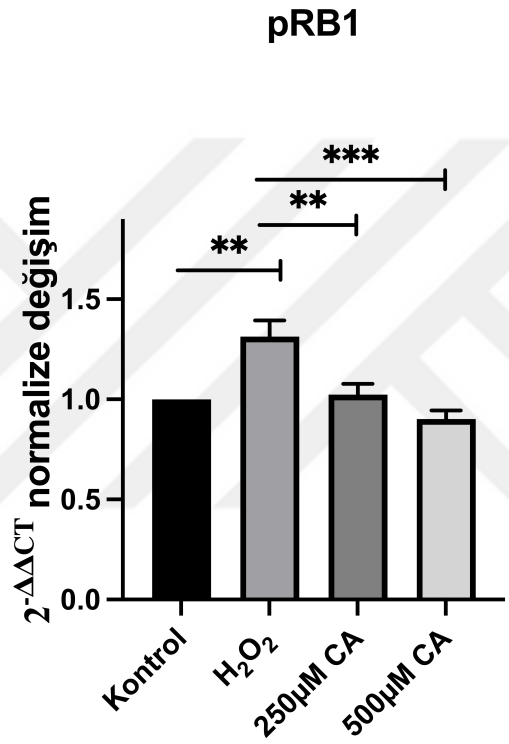


Şekil 3.23 p16 gen ekspresyonu analiz grafiği

- pRB1 Gen Ekspresyon Seviyesi

Bu analiz, pRB1 gen ekspresyonuna ilişkin istatistiksel verileri ortaya koymuştur. Kontrol ve H_2O_2 ile muamele edilen gruplar arasında pRB1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p = 0.0032), bu da H_2O_2 kaynaklı oksidatif stresin, yaşlanma sırasında hücre döngüsü durmasını sağlayan pRB1'in yukarı regülasyonunu tetiklediğini göstermektedir. Kontrol ve 250 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p = 0.9885). Benzer şekilde, kontrol ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasındaki fark da anlamlı değildir (p = 0.5586). H_2O_2 ile muamele edilen ve 250 µM CA ile muamele edilen gruplar arasındaki pRB1 ekspresyon farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p = 0.0062), bu da bu CA konsantrasyonunun pRB'nin yukarı regülasyonunu baskılayabileceğini göstermektedir. pRB1 ekspresyonunun, H_2O_2 ile muamele edilen gruba kıyasla 500 µM CA ile muamele edilen grupta önemli ölçüde daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (p = 0.0002). Bu veriler, CA'nın oksidatif strese karşı doz bağımlı bir etkisi olduğunu öne sürmektedir. 250 µM ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında pRB1 ekspresyonunda istatistiksel

olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p = 0.3819), bu da her iki CA dozunun da stres kaynaklı pRB1 artışını önleyebileceğini, ancak etkisinin daha yüksek konsantrasyonlarda bir sınıra ulaşabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, CA'nın, hücre döngüsünün ilerlemesini ve senesensi kontrol etmede kritik olan pRB1 yolunu düzenlemedeki potansiyel rolünü vurgulamaktadır. Oksidatif strese yanıt olarak pRB1 ekspresyonunu aşağı regüle ederek, CA kalıcı hücre döngüsü durmasını önleyebilir ve yaşlanmanın hastalıklara katkıda bulunduğu durumlarda potansiyel terapötik faydalar sunabilir (Şekil 3.24).

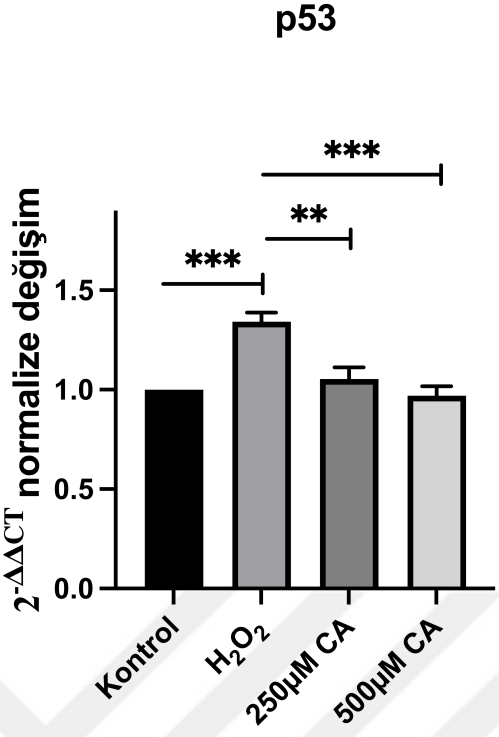


Şekil 3.24 pRB1 gen ekspresyonu analiz grafiği

- p53 Gen Ekspresyon Seviyesi

Bu analiz, p53 gen ekspresyonuna ilişkin istatistiksel verileri ortaya koymuştur. Kontrol ve H_2O_2 ile muamele edilen gruplar arasında p53 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p = 0.0007), bu da oksidatif stresin p53'ü yukarı regüle ederek hücresel stres tepkilerini tetiklediğini göstermektedir. p53'ün tümör baskılayıcı olarak bilinen ve hücrede kritik süreçleri yöneten bir protein olduğu bilinmektedir. Bu artış, H_2O_2'nin hücrelerde bir stres tepkisini başlatmak için p53'ü aktive ettiğini ve bunun hücresel yaşlanmaya veya hücre ölümüne yol açabileceğini öne sürmektedir. Kontrol grubu ile 250 µM CA ile

muamele edilen gruplar arasındaki karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.8179$). Kontrol grubu ile 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasındaki fark da önemsizdir ($p = 0.9604$). Bununla birlikte, H_2O_2 ile muamele edilen grup ile 250 µM CA ile muamele edilen grup karşılaştırıldığında p53 ekspresyonunda önemli bir azalma gözlenmiştir ($p = 0.0029$), bu da bu dozda CA'nın, H_2O_2'nin neden olduğu p53 aktivasyonunu hafifletebileceğini göstermektedir. H_2O_2 ile muamele edilen grup ile 500 µM CA ile muamele edilen grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p = 0.0003$). Bu, CA'nın daha yüksek konsantrasyonlarda p53 yollarını daha etkili bir şekilde modüle edebileceğini göstermektedir. 250 µM ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında p53 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.5442$), bu da her iki dozun da p53 ekspresyonunu benzer şekilde etkilediğini ve etkinin daha yüksek konsantrasyonlarda bir sınıra ulaşabileceğini göstermektedir. p53'ün hücresel strese yanıt olarak aktive olduğu ve çeşitli diğer hücresel yollarla etkileşimde bulunduğu göz önünde bulundurulduğunda, CA'nın p53 yukarı regülasyonunu baskılayabilme yeteneği, onun terapötik bir ajan olarak potansiyelini vurgulamaktadır. Bu bulgular, p53'ün baskın bir role sahip olduğu patolojik durumlarda CA'nın koruyucu bir ajan olarak düşünülebileceğini öne sürmektedir (Şekil 3.25).

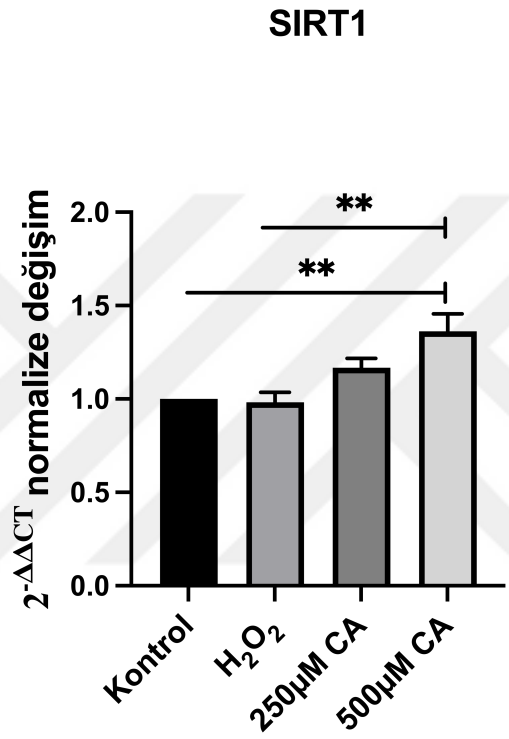


Şekil 3.25 p53 gen ekspresyonu analiz grafiği

- SIRT1 Gen ekspresyon Seviyesi

Bu analiz, SIRT1 gen ekspresyonuna ilişkin istatistiksel verileri ortaya koymuştur. Kontrol ve H_2O_2 ile muamele edilen gruplar arasında SIRT1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.9964$), bu da oksidatif stresin SIRT1 seviyelerini önemli ölçüde baskılamadığını göstermektedir. Kontrol ve 250 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.2556$). Ancak, kontrol grubu ile 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p = 0.0052$). H_2O_2 ile muamele edilen grup ile 250 µM CA ile muamele edilen grup arasındaki SIRT1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.1863$), bu da düşük CA dozlarının oksidatif stresin etkilerini SIRT1 aracılığıyla dengelemek için yeterli olmayabileceğini göstermektedir. H_2O_2 ile muamele edilen grup ile 500 µM CA ile muamele edilen grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p = 0.0036$). Bu bulgu, daha yüksek CA konsantrasyonlarının SIRT1'i etkili bir şekilde yukarı regüle edebileceğini ve ilişkili antioksidan yolları aktive ederek oksidatif hasara karşı potansiyel olarak koruma sağlayabileceğini düşündürmektedir. 250 µM ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında SIRT1 ekspresyonunda istatistiksel olarak

anlamlı bir fark bulunmamıştır (p = 0.1494), bu da CA tedavisi ile SIRT1 ekspresyonunun arttığını, ancak bu etkinin bu doz aralığında doza bağlı olmayabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar, özellikle yüksek konsantrasyonlarda CA'nın SIRT1 aktivitesini modüle etmedeki potansiyel rolünü vurgulamaktadır. SIRT1'in hücresel sağlığın korunmasında ve reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı mücadeledeki kritik rolü göz önüne alındığında, CA'nın SIRT1 modülasyonu üzerindeki etkisi önemlidir (Şekil 3.26).

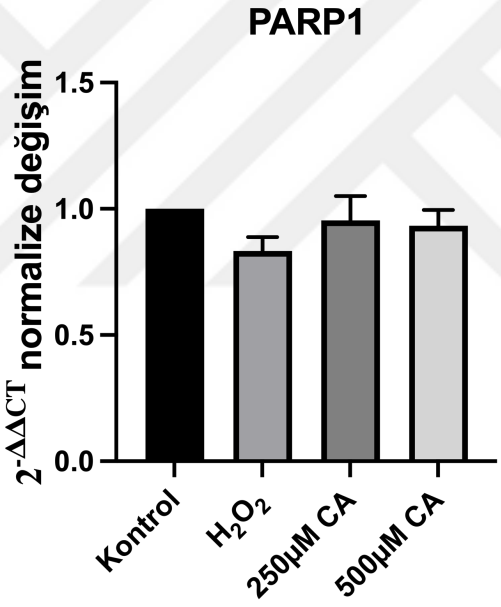


Şekil 3.26 SIRT1 gen ekspresyonu analiz grafiği

- PARP1 Gen Ekspresyon Seviyesi

Bu analiz, PARP1 gen ekspresyonuna ilişkin istatistiksel verileri ortaya koymuştur. Kontrol ve H_2O_2 ile muamele edilen gruplar arasında PARP1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p = 0.3161), bu da H_2O_2 kaynaklı oksidatif stresin PARP1 seviyelerini önemli ölçüde değiştirmek için yeterli olmayabileceğini göstermektedir. Kontrol grubu ile 250 µM CA ile muamele edilen gruplar arasındaki karşılaştırmada da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p = 0.9549). Kontrol grubu ile 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasındaki fark da anlamsız bulunmuştur (p = 0.8773). Diğer yandan, H_2O_2 ile muamele edilen grup ile 250 µM CA ile muamele edilen grup arasında PARP1

ekspresyonu farkı istatistiksel olarak anlamlı değildir (p = 0.5601). Benzer şekilde, H_2O_2 ile muamele edilen grup ile 500 µM CA ile muamele edilen grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p = 0.6908). 250 µM ve 500 µM CA ile muamele edilen gruplar arasında PARP1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (p = 0.9951). Bu bulgular, DNA hasar yanıtı ve onarım yolunun önemli bir parçası olan PARP1'in, oksidatif stres ve CA tedavisinden etkilenmediğini önermektedir. PARP1 ekspresyonunda anlamlı değişikliklerin olmaması, CA'nın diğer moleküler mekanizmalar veya yollar aracılığıyla etkiler gösterebileceğini, ancak PARP1 aracılı DNA onarım yolunu doğrudan modüle etmediğini göstermektedir. Bu bulgu, CA'nın diğer bağlamlarda gözlemlenen koruyucu veya terapötik potansiyelinin, doğrudan PARP1 aracılı yollar yerine başka yolları içerebileceğini düşündürebilir (Şekil 3.27).

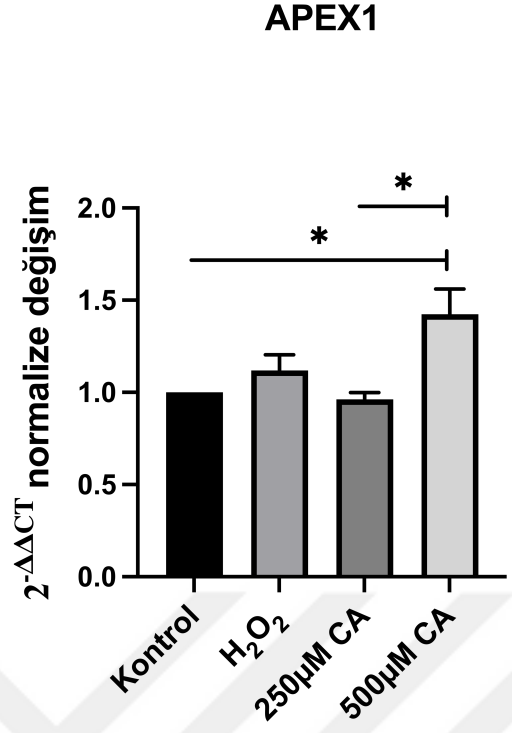


Şekil 3.27 PARP1 gen ekspresyonu analiz grafiği

- APEX1 Gen Ekspresyon Seviyesi

Bu analiz, APEX1 gen ekspresyonuna dair istatistiksel verileri ortaya koydu. Kontrol grubu ile H_2O_2 ile muamele edilmiş gruplar arasında APEX1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p = 0.7443), bu da oksidatif stresin APEX1 seviyelerini önemli ölçüde değiştirmediğini göstermektedir. Kontrol grubu ile 250 µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p = 0.9879). Ancak, kontrol grubu ile 500 µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak

anlamlı bir fark bulunmuştur (p = 0.0268), bu da daha yüksek konsantrasyonlarda CA'nın, DNA onarım yollarını artırarak genotoksik strese karşı koruma sağlayabileceğini düşündürmektedir. H_2O_2 ile muamele edilmiş grup ile 250 µM CA ile muamele edilmiş grup arasında APEX1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p = 0.5669), bu da düşük CA dozunun, oksidatif stres etkilerini APEX1 düzenlenmesi seviyesinde engellemek için yeterli olmayabileceğini göstermektedir. H_2O_2 ile muamele edilmiş grup ile 500 µM CA ile muamele edilmiş grup arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p = 0.1118). Bu bulgu, H_2O_2 ile indüklenen oksidatif stresin APEX1 seviyelerini önemli ölçüde değiştirmediğini göstermektedir. Bununla birlikte, daha yüksek CA dozu APEX1 seviyelerini artırarak hücrenin oksidatif DNA hasarını onarma kapasitesini artırabilir. 250 µM ve 500 µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasındaki karşılaştırma, APEX1 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir (p = 0.0173). Bu sonuçlar, Şelidonik asidin APEX1 ekspresyonunu düzenlemedeki potansiyel rolünü vurgulamaktadır. APEX1'in genomik bütünlüğün korunmasındaki kritik rolü göz önüne alındığında, bu düzenlemenin, CA'nın DNA onarım kapasitesinin azaldığı durumlarda terapötik faydalar sağlayabileceğini öne sürmektedir (Şekil 3.28).

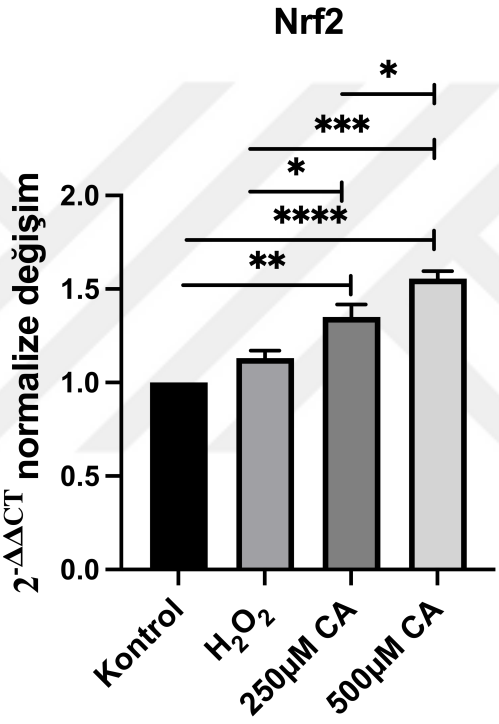


Şekil 3.28 APEX1 gen ekspresyonu analiz grafiği

- Nrf2 Gen Ekspresyon Seviyesi

Bu analiz, oksidatif strese karşı antioksidan yanıtın ve hücresel savunma mekanizmalarının düzenlenmesinde kilit bir rol oynayan Nrf2 gen ekspresyonuna dair istatistiksel verileri ortaya koymaktadır. Kontrol grubu ile H_2O_2 ile muamele edilmiş gruplar arasında Nrf2 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.2317$), bu da H_2O_2 ile indüklenen oksidatif stresin, bu koşullar altında Nrf2'nin aşağı regülasyonunu tetiklemek için yeterli olmayabileceğini göstermektedir. Ancak, kontrol grubu ile 250 µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p = 0.0021$), bu da CA'nın daha düşük konsantrasyonlarda bile Nrf2 aktivitesini artırabileceğini işaret etmektedir. Kontrol grubu ile 500 µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p < 0.0001$), bu da CA'nın Nrf2 aktivasyonunda doz-bağımlı bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. H_2O_2 ile muamele edilmiş grup ile 250 µM CA ile muamele edilmiş grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 0.0300$), bu da CA'nın oksidatif stres varlığında Nrf2'yi etkili bir şekilde yukarı regüle edebileceğini göstermektedir. H_2O_2 ile muamele edilmiş grup ile 500 µM CA ile muamele edilmiş grup arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0.0006$). Bu bulgu, CA'nın hücrenin

antioksidan savunma yanıtını artırma potansiyelini vurgulamaktadır. 250 µM ve 500 µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasında Nrf2 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır (p = 0.0434), bu da CA'nın Nrf2 aktivasyonu üzerindeki doz-bağımlı etkisini vurgulamaktadır. Bu bulgular, CA'nın Nrf2 aracılı antioksidan yanıtları artırma potansiyelini ortaya koymaktadır. Nrf2'nin oksidatif hasardan hücreleri korumadaki merkezi rolü göz önüne alındığında, CA'nın bu yolu yukarı regüle etme yeteneği, oksidatif strese karşı önemli koruyucu faydalar sağlayabileceğini ve hücresel dayanıklılığı artırmaya yönelik terapötik stratejiler için umut verici bir aday olabileceğini göstermektedir (Şekil 3.29).

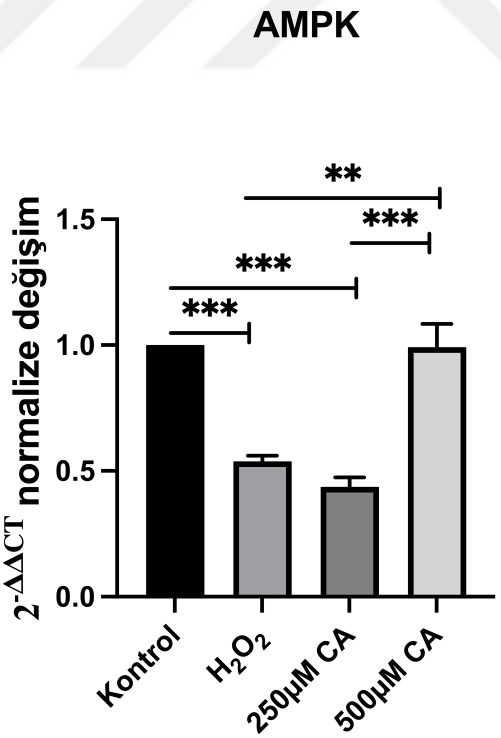


Şekil 3.29 Nrf2 gen ekspresyonu analiz grafiği

- AMPK Gen Ekspresyon Seviyesi

Bu analiz, hücresel enerji homeostazı ve metabolik stres yanıtlarının önemli bir düzenleyicisi olan AMPK gen ekspresyonuna dair istatistiksel verileri ortaya koymaktadır. Kontrol grubu ile H_2O_2 ile muamele edilmiş gruplar arasında AMPK ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p = 0.0010), bu da AMPK aktivitesinin baskılandığını ve hücrenin enerji seviyelerini yönetme kapasitesinde bir azalmayı işaret edebileceğini göstermektedir. Kontrol grubu ile 250 µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p = 0.0002). Kontrol grubu ile 500 µM CA ile muamele edilmiş gruplar

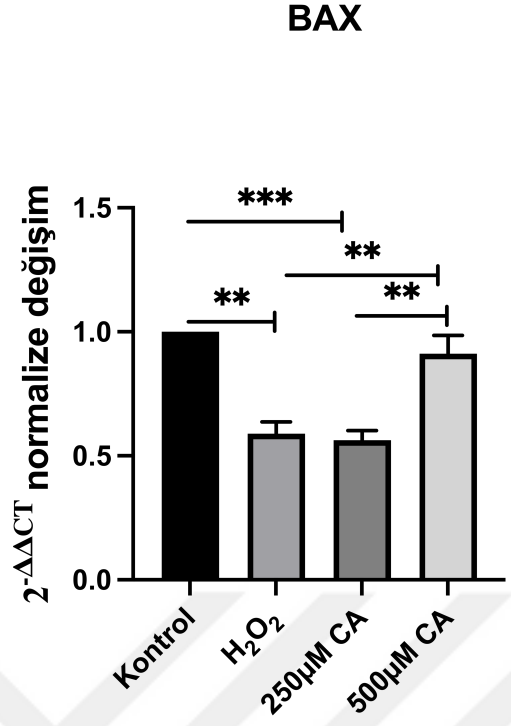
arasındaki fark ise anlamlı değildir (p = 0.9994), bu da 500 µM CA ile muamele edilmiş grubun AMPK ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna benzer olduğunu göstermektedir. H_2O_2 ile muamele edilmiş grup ile 250 µM CA ile muamele edilmiş grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p = 0.5300). Bununla birlikte, H_2O_2 ile muamele edilmiş grup ile 500 µM CA ile muamele edilmiş grup arasındaki ekspresyon farkı önemli bulunmuştur (p = 0.0011), bu da daha yüksek CA dozlarının AMPK ekspresyonunu modüle edebileceğini ve hücrenin oksidatif strese karşı adaptasyonunu iyileştirebileceğini göstermektedir. 250 µM ve 500 µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasındaki AMPK ekspresyon farkı da istatistiksel olarak anlamlıdır (p = 0.0003), bu da CA'nın doz-bağımlı bir etkisi olduğunu ve daha yüksek CA konsantrasyonlarının AMPK aktivitesini güçlü bir şekilde etkileyebileceğini işaret etmektedir. Bu bulgular, CA'nın hücresel enerji dengesi ve metabolik stres yönetiminde önemli bir rol oynayan AMPK yollarını önemli ölçüde etkileyebileceğini göstermektedir. CA'nın AMPK'yı modüle etme kapasitesi, hücrelerin strese karşı dayanıklılığını artırmak ve metabolik sağlığı iyileştirmek açısından önemli olabilir (Şekil 3.30).



Şekil 3.30 AMPK gen ekspresyonu analiz grafiği

- BAX Gen Ekspresyon Seviyesi

Bu analiz, hücresel ölüm yollarını düzenleyen önemli bir pro-apoptotik faktör olan BAX gen ekspresyonuna ilişkin istatistiksel verileri ortaya koymaktadır. Kontrol grubu ile H_2O_2 ile muamele edilmiş gruplar arasında BAX ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p = 0.0014$). Bu sonuç, H_2O_2 ile muamele edilen grupta kontrol grubuna kıyasla BAX ekspresyonunda önemli bir azalma olduğunu desteklemektedir ($p = 0.0014$). Ayrıca, yaşlanmaya maruz kalan hücrelerin apoptoza karşı direnç geliştirdiğini göstermektedir. Kontrol grubu ile 250 µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir ($p = 0.0009$). Ancak, kontrol grubu ile 500 µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasındaki fark anlamlı değildir ($p = 0.5856$). Bu bulgu, daha yüksek CA dozlarının yaşlanmış hücrelerde BAX'ı yukarı regüle ederek hücresel homeostazı koruyabileceğini düşündürmektedir. H_2O_2 ile muamele edilmiş grup ile 250 µM CA ile muamele edilmiş grup arasındaki BAX ekspresyonu farkı istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p = 0.9804$), bu da düşük doz CA'nın oksidatif stres kaynaklı BAX azalmasını hafifletmediğini göstermektedir. H_2O_2 ile muamele edilmiş grup ile 500 µM CA ile muamele edilmiş grup arasında BAX ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir ($p = 0.0062$). 250 µM ve 500 µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasındaki BAX ekspresyon farkı da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0.0039$), bu da CA'nın doz-bağımlı bir etkisini işaret etmektedir. Bu bulgular, Şelidonik asidin BAX ekspresyonunu modüle ederek hücrelerin apoptoza direnç geliştirme kapasitesini azaltabileceğini düşündürmektedir. 500 µM CA grubunun kontrol grubuna yakın sonuçlar göstermesi, CA'nın hücresel denge üzerindeki koruyucu rolünü vurgulamakta ve oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı potansiyel bir koruyucu ajan olarak değerlendirilmesi gerektiğini önermektedir (Şekil 3.31).

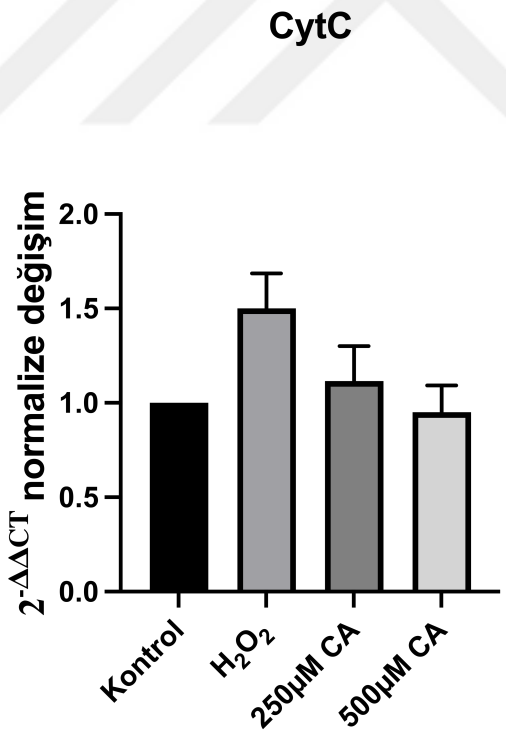


Şekil 3.31 BAX gen ekspresyonu analiz grafiği

- CytC Gen Ekspresyon Seviyesi

Bu analiz, programlanmış hücre ölümüne yol açan kaspazların aktivasyonunu tetikleyerek intrinsik apoptoz yolunda kritik bir rol oynayan Sitokrom c (CytC) gen ekspresyonuna ilişkin istatistiksel verileri ortaya koymaktadır. Kontrol ve H_2O_2 ile muamele edilmiş gruplar arasında CytC ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.1616$). Ancak, H_2O_2 grubunda mütevazı bir CytC ekspresyonu artışı gözlemlenmiştir. Bu durum, oksidatif stres nedeniyle mitokondrilerde artan H_2O_2 seviyelerine bağlanabilir. Bu bulgu, oksidatif stresin ciddi düzeyde olmamasına rağmen mitokondriyal fonksiyonu etkileyebileceğini, ancak apoptoza yol açacak düzeyde olmadığını göstermektedir. Kontrol grubu ile 250 µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p = 0.9431$). Benzer şekilde, kontrol grubu ile 500 µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.9953$). Bu bulgular, her iki CA konsantrasyonunun da CytC ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna benzer olduğunu göstermektedir. H_2O_2 ile muamele edilmiş grup ile 250 µM CA ile muamele edilmiş grup arasındaki CytC ekspresyonunda anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.3340$). H_2O_2 ile muamele edilmiş grup ile 500 µM CA ile muamele edilmiş grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark

gözlemlenmemiştir (p = 0.1173). Ancak, 500 µM CA grubunun CytC ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna benzer olması, bu daha yüksek CA konsantrasyonunun apoptotik yanıtları stabilize etmeye ve hücreler üzerinde koruyucu bir etki göstermeye yardımcı olabileceğini düşündürmektedir. 250 µM ve 500 µM CA ile muamele edilmiş gruplar arasında CytC ekspresyonunda anlamlı bir fark bulunmamıştır (p = 0.8598), bu da CA dozunun artırılmasının CytC ekspresyonunda önemli değişikliklere yol açmadığını göstermektedir. Bu bulgular, H_2O_2 kaynaklı oksidatif stresin mitokondriyal H_2O_2 artışına bağlı olarak hafif bir CytC seviyesinde artışa yol açabileceğini, ancak bu artışın apoptozu tetikleyecek seviyelere ulaşmadığını göstermektedir. Ayrıca, CA ile tedavi edilen grupların CytC ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna benzer olması, CA'nın hücresel homeostazı korumada ve oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı potansiyel koruma sağlamada rol oynayabileceğini düşündürmektedir. CA'nın bu koruyucu etkileri, CytC'yi içeren intrinsik apoptotik yolak dışındaki mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşebilir (Şekil 3.32).



Şekil 3.32 CytC gen ekspresyonu analiz grafiği

Gen ekspresyonu analizinde elde edilen fold değişim değerleri, SIPS ve CA ile tedavi edilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla değişiklikler göstermiştir. Ancak, çoğu gen için fold değişimlerinin 1 ile 1.5 arasında olduğu gözlenmiştir. SIPS

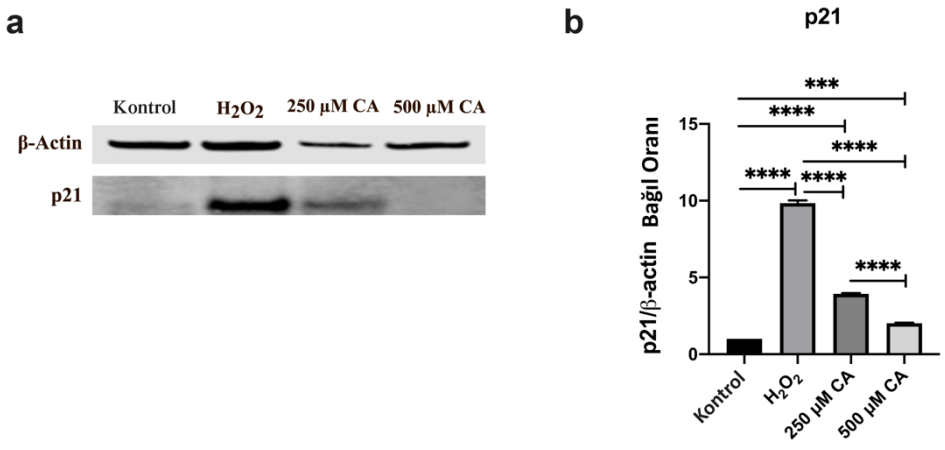
modellerinde, indüklenen stres, sitotoksisiteyi önlerken senesensi teşvik edecek şekilde kontrol edilmektedir. Bu kontrollü model, gen ekspresyonunda şiddetli değil, hafif değişikliklere yol açmaktadır. Bu nedenle, gen ekspresyonundaki fold değişimleri daha akut stres veya hasar modellerine kıyasla daha düşük olabilir. Bu bulgu, CA tedavisinin DNA hasar onarımı ve oksidatif stres yanıtıyla ilişkili gen ekspresyonunu etkilemesine rağmen, bu değişikliklerin mütevazı kaldığını göstermektedir. Bu sonuçlar, önerilen SIPS değerlendirmesi ile tutarlıdır.

3.3.2 Western Blot Protein Analiz Sonuçları

Bu çalışma, küçük mRNA ekspresyon değişikliklerinin protein ekspresyonunu önemli ölçüde etkileyebileceğini göstermektedir. Kontrol grubuna kıyasla mRNA ekspresyon seviyesinde anlamlı ekspresyon değerlerine sahip üç senesens belirteci geni (p21, p16 ve pRB1) ayrıca protein seviyesinde de değerlendirilmiştir. Doğru bir kantifikasyon sağlamak için, Western blot analizlerimizde β-actin referans (housekeeping) proteini olarak kullanılmıştır. Western blot görüntüleri ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Western blot analizleri, SIPS ile ilişkili p21, p16 ve pRB1 protein seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla arttığını ortaya koymuştur. Bu artış, oksidatif strese maruz kalan gruplarda bantların belirgin bir şekilde yoğunlaşmasıyla görsel olarak desteklenmiştir. Ayrıca, Şekil 3.33, 3.34 ve 3.35 'daki densitometrik bar grafikleri, protein ekspresyonundaki nicel değişiklikleri zamanla göstermektedir; belirgin pik yükseklikleri stres koşullarıyla ilişkilendirilmiştir.

Şelidonik asit tedavisinin p21 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Kontrol ve H_2O_2 grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.0001$), bu da oksidatif stresin mRNA seviyesinde önemli bir değişiklik olmamasına rağmen p21'i protein seviyesinde yukarı düzenlediğini göstermektedir. Bu bulgu, oksidatif stres koşulları altında p21 protein stabilitesini veya translasyonunu artırarak bir post-transkripsiyonel düzenleme mekanizmasını düşündürmektedir. Kontrol grubu ile 250 μM CA ($p < 0.0001$) ve 500 μM CA ($p = 0.0002$) grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Ayrıca, H_2O_2 ve 250 μM CA ($p < 0.0001$) ve 500 μM CA ($p < 0.0001$) grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır, bu da CA'nın oksidatif stres kaynaklı p21 artışını etkili bir şekilde engelleyebileceğini göstermektedir. 250 μM CA ve 500 μM CA grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.0001$). 500 μM

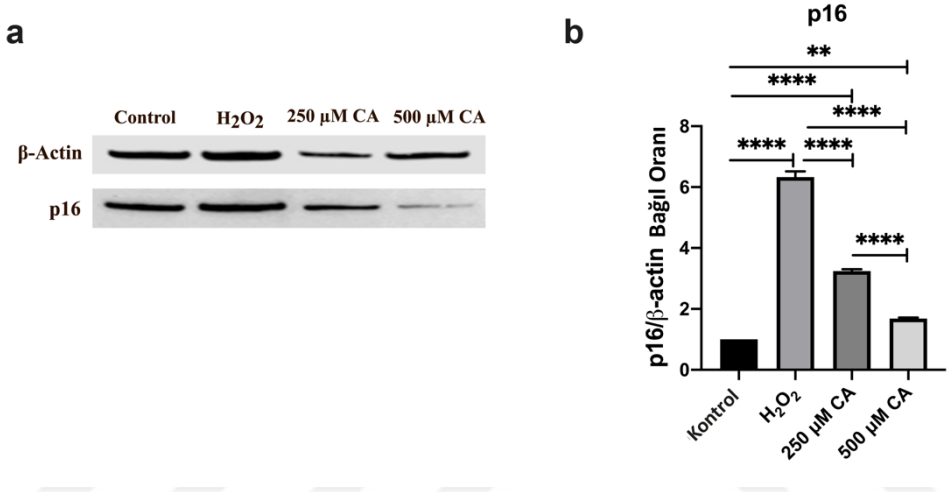
CA grubunun, 250 µM CA grubuna göre daha düşük p21 protein seviyeleri göstermesi ($p < 0.0001$), CA'nın p21 protein ekspresyonunu düşürmede doz bağımlı etkisini vurgulamaktadır, bu da gözlemlenen gen ekspresyonu eğilimleriyle uyumludur. Bu bulgular, oksidatif stresin p21 gen ekspresyonunu önemli ölçüde değiştirmediğini göstermektedir. Şelidonik asit, özellikle yüksek konsantrasyonlarda, p21 protein seviyelerini aşağı düzenleyerek koruyucu bir etki göstermiş ve erken senesansın başlamasını hafifletebilir. p21'in hem gen hem de protein seviyelerinde çift modülasyonu, CA'nın özellikle p53-p21 yolunun modülasyonu yoluyla hücresel senesens ve ilişkili patolojilerin yönetiminde terapötik bir ajan olarak potansiyelini vurgulamaktadır. (Şekil 3.33).



Şekil 3.33 p21 (a) Western blot bant görseli (b) p21 protein seviyesi densitometrik analizi

Benzer şekilde, Şelidonik asit (CA) tedavisinin p16 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi de değerlendirilmiştir. Sonuçlar, H_2O_2 ile tedavi edilen grupta p16 protein seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu göstermiştir ($p < 0.0001$). Bu bulgu, oksidatif stresin p16 protein ekspresyonunu indüklediğini göstermektedir. Ayrıca, kontrol grubu ile hem 250 µM CA ($p < 0.0001$) hem de 500 µM CA ($p = 0.005$) ile tedavi edilen gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmiştir, bu da CA'nın oksidatif stres yokluğunda bile p16 protein seviyelerini modüle edebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, H_2O_2 grubu ile 250 µM CA ($p < 0.0001$) ve 500 µM CA ($p < 0.0001$) grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ve bu da CA'nın stres kaynaklı p16 artışını etkili bir şekilde azaltabileceğini göstermektedir. 500 µM CA

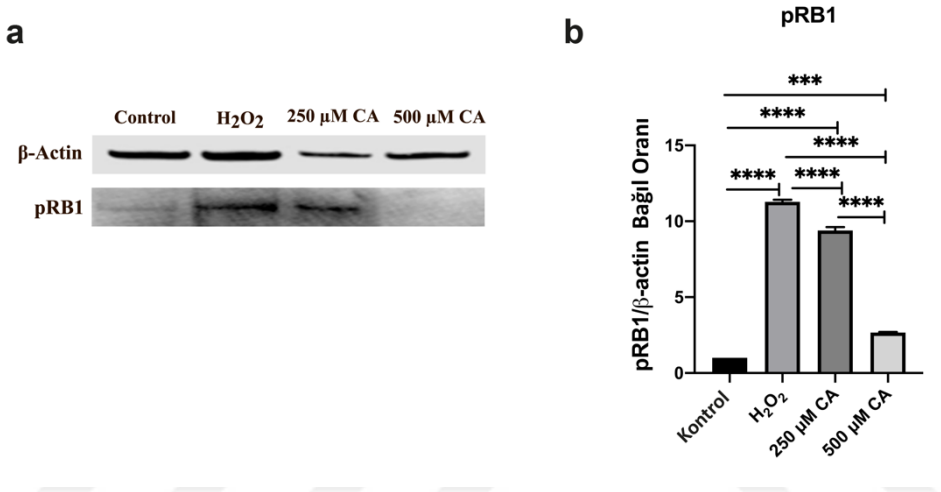
grubunun, 250 µM CA grubuna göre anlamlı derecede daha düşük p16 protein seviyelerine sahip olması ($p < 0.0001$), CA'nın p16 ekspresyonunu düşürmede doz bağımlı etkisini vurgulamaktadır. Bu bulgular, oksidatif stresin p16 protein seviyelerini artırdığını göstermektedir. Şelidonik asit, p16 protein seviyelerini düşürerek koruyucu bir etki göstermekte ve potansiyel olarak senesans belirteçlerini hafifletmektedir. p16'nın hem gen hem de protein seviyelerinde çift modülasyonu, CA'nın hücresel senesens ve ilişkili patolojilerin yönetiminde terapötik bir ajan olarak potansiyelini vurgulamaktadır (Şekil 3.34)



Şekil 3.34 p16 (a) Western blot bant görseli (b) p16 protein seviyesi densitometrik analizi

Son olarak, Şelidonik asit (CA) tedavilerinin pRB1 protein ekspresyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Tukey testi, H_2O_2 ile tedavi edilen grupta pRB1 protein seviyelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiğini ortaya koymuştur ($p < 0.0001$), bu da oksidatif stresin pRB1 proteinini yukarı düzenlediğini doğrulamaktadır. Kontrol grubu ile hem 250 µM CA ile tedavi edilen grup ($p < 0.0001$) hem de 500 µM CA ile tedavi edilen grup ($p = 0.0001$) arasında pRB1 protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlemlenmiştir, bu da CA tedavisinin pRB1 protein seviyelerini etkilediğini düşündürmektedir. CA tedavileri, oksidatif stres kaynaklı pRB1 protein seviyelerindeki artışı önemli ölçüde azaltmıştır. 250 µM CA ile tedavi edilen grup ($p < 0.0001$) ve 500 µM CA ile tedavi edilen grup ($p < 0.0001$), H_2O_2 ile tedavi edilen gruba göre anlamlı derecede daha düşük pRB1 protein seviyeleri göstermiştir, bu da CA'nın stres kaynaklı pRB1 artışını hafifletebileceğini göstermektedir. Ayrıca, 250 µM ve 500

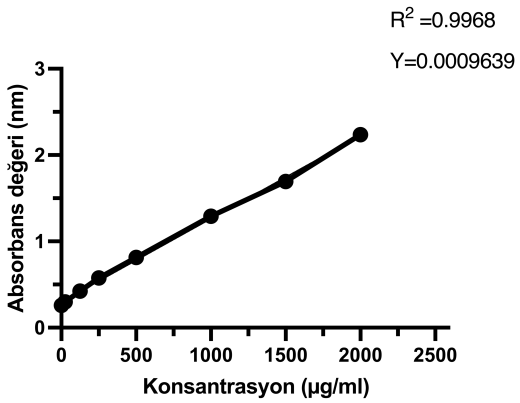
μM CA ile tedavi edilen gruplar arasındaki pRB1 protein seviyelerindeki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.0001$), bu da CA'nın pRB1 protein ekspresyonunu modüle etmede doz bağımlı bir etki gösterdiğini vurgulamaktadır. Bu bulgular, şelidonik asidin özellikle yüksek konsantrasyonlarda oksidatif strese yanıt olarak pRB1 protein ekspresyonunu etkili bir şekilde aşağı düzenlediğini göstermektedir. CA, stres kaynaklı kalıcı hücre döngüsü durmasını önlemeye yardımcı olabilir ve oksidatif stres ve senesens da dahil olmak üzere koşulların yönetiminde potansiyel terapötik rolünü vurgulamaktadır (Şekil 3.35).



Şekil 3.35 pRB1 (a) Western blot bant görseli (b) pRB1 protein seviyesi densitometrik analizi

3.3.3 Bikinkoninik Asit (BCA) Protein Testi Sonuçları

Bikinkoninik Asit kiti kullanılarak protein miktarının belirlenmesi amacıyla standart eğri oluşturulmuştur. Bu işlemde, bilinen konsantrasyonlardaki protein çözeltileri kullanılarak standart bir eğri çizilmiş, ardından bu eğri kullanılarak hücre lizatı örneklerinin protein miktarları hesaplanmıştır. Standart eğri, absorbans değerlerinin protein konsantrasyonları ile ilişkisini gösteren doğrusal bir grafik olup, örneklerin absorbans değerleri bu eğri ile karşılaştırılarak protein miktarları tayin edilmiştir. BCA yöntemi, bakır iyonlarının proteinlerle reaksiyonu sonucu oluşan mor renkli kompleksin spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanmakta olup, hassas ve güvenilir bir yöntem olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Şekil 3.36).



Şekil 3.36 BCA standart eğri grafiği

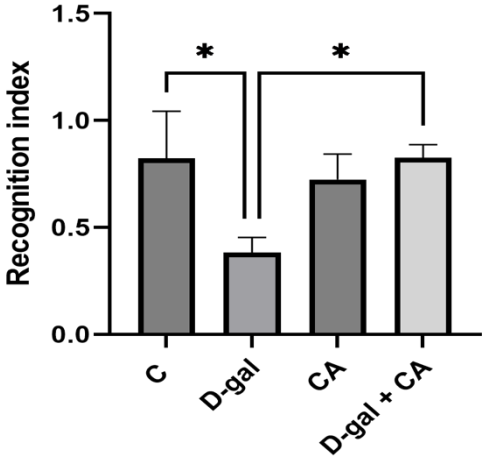
3.4 In Vivo Sonuçlar

3.4.1 Yeni Obje Tanıma Testi

D-galaktoz ile indüklenen yaşlanma modeli, yaşlanma süreçlerini incelemek için yaygın olarak kullanılan bir modeldir. Bu model kısa ve uzun süreli tanıma sonuçları yaşlanma ile ilişkili bilişsel işlevlerin bozulmasını değerlendirmek için kullanılmıştır. İstatistiksel analiz için ANOVA-LSD testlerini yapmak üzere GraphPad kullanılmıştır. Her veri noktası ortalama ± standart hata ve anlamlılık $p<0.05$ seviyeleri olarak sunulmuştur.

- Kısa süreli tanıma

Bu tür testler, deneklerin belirli bir uyarıcıyı kısa bir süre içinde hatırlama ve bu uyarıcıyı diğerlerinden ayırma becerisini ölçer. D-galaktoz ile indüklenen yaşlanma modelinde, kısa süreli bellek ve tanıma süreçlerinde bozulma görülebilir. Bu durum, yaşlanma sürecine bağlı oksidatif stres, iltihaplanma ve nörodejeneratif değişikliklerle ilişkilendirilebilir (Şekil 3.37).



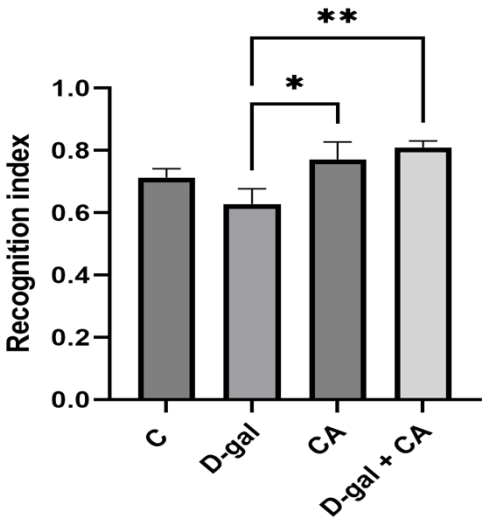
Şekil 3.37 Kısa süreli tanıma sonuç grafiği

- Uzun süreli tanıma

Uzun süreli bellek ve tanıma testleri ise deneklerin belirli uyarıcıları uzun bir süre sonra hatırlama yeteneğini ölçer. D-galaktozun uzun süreli uygulanması, beyinde yaşlanma ile ilişkili hasarları artırarak, uzun süreli bellek ve tanıma yetilerinin daha ciddi bir şekilde bozulmasına yol açabilir (Şekil 3.38). Bu modelde, yaşlanma ile ilişkili bilişsel bozuklukların etkisini değerlendirmek amacıyla uzun süreli tanıma testleri yapılır.

D-galaktozun indüklediği yaşlanma modeli, oksidatif stres, nöroinflamasyon ve mitokondriyal işlev bozukluğu gibi süreçleri taklit ederek yaşlanmaya bağlı bilişsel bozuklukların mekanizmalarını araştırmak için kullanılır. Kısa ve uzun süreli tanıma testleri, bu süreçlerin nasıl etkilendiğini gösteren önemli parametreler sunar.

Kısa ve uzun süreli tanıma analiz sonuçları, Şelidonik asit gibi potansiyel terapötik ajanların, yaşlanma ile ilişkili bilişsel bozukluklar üzerine etkisini göstermektedir.



Şekil 3.38 Uzun süreli tanıma sonuç grafiği

4
SONUÇ

4.1 Sonuçlar

Bu çalışma, H_2O_2'nin neden olduğu erken yaşlanma üzerinde Şelidonik asit'in etkilerini ve mekanizmalarını BJ fibroblast hücrelerinde araştıran ilk çalışmadır. CA tedavisinin, doz bağımlı bir şekilde hücresel senesensi etkili bir şekilde azalttığını bulduk. Altta yatan mekanizmalar, p53, pRB1 ve SIRT1 gibi kritik yaşlanma ile ilişkili yolların düzenlenmesi ile bağlantılıydı. Bulgularımız, CA'nın senolitik bir ajan olarak işlev görme potansiyelini vurgulamaktadır.

Şelidonik asit, sekonder bir bitki metaboliti olarak, hücresel senesensi hafifletmek veya tersine çevirmek için önemli farmakolojik özellikler sergilemektedir. CA'nın anti-enflamatuar özellikleri, hücresel stresi azaltarak ve hücresel ortamı iyileştirerek yaşlanma sürecini yavaşlatabilir [237]. CA'nın, yaşlanma sürecine ve hücresel yaşlanmaya katkıda bulunan IL-6 ve TNF-α gibi pro-enflamatuar sitokin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Ek olarak, çalışmalar CA'nın siklooksijenaz-2 (COX-2) [236] ve hipoksi indüklenebilir faktör-1a (HIF-1a) [282] ifadesini azaltarak oksidatif stres hasarını hafiflettiğini göstermiştir. Bu bulgu, CA'nın hücresel yaşlanmaya karşı mücadelede önemli bir bileşik olduğunu göstermektedir. Literatür bulgularıyla tutarlı olarak, verilerimiz CA'nın senesensi tetikleyen altta yatan mekanizmalar üzerinde etkili olduğunu ve hücresel sağlığı uzatmak ve yaşa bağlı hastalıklarla mücadele etmek için terapilerde faydalı olabileceğini önermektedir.

Erken yaşlanma, deneysel koşulların dikkatli kalibrasyonunu gerektiren bir hücresel mekanizmadır. Araştırmacılar, senesensi indüklemek için oksidatif tedavileri en aza indirme stratejisi kullanarak doğal yaşlanma süreçlerindeki oksidatif stresin kademeli birikimini taklit etmektedirler [283]. Bu şekilde, nekroz

veya apoptozu tetikleyebilecek aşırı hasarlardan kaçınılmakta ve gözlemlenen etkilerin yaşlanma yoluna özgü olması sağlanmaktadır. Oksidatif stresi minimum yeterli seviyeye ince ayar yapmak, oksidatif hasarın hücreleri yaşlanmaya ittiği eşiği aydınlatarak hücresel yaşlanmada stres ve hayatta kalma arasındaki hassas dengeyi açıklığa kavuşturabilir [261]. Literatür verilerine dayanarak, çalışmamızda BJ fibroblast hücreleri, kontakt inhibisyon veya aşırı çoğalmayla tetiklenen replikatif senesensi önlemek için yaklaşık %60 hücre yoğunluğuna ulaştığında kültüre edilmiştir. Replikatif yaşlanmanın ortaya çıkmasını önlemek için tüm deneylerde erken evre hücreler kullanılmıştır; hem replikatif hem de strese bağlı yaşlanmanın ana özelliklerinin benzer olduğu bilinmektedir [284]. BJ fibroblast hücre hattı için bir büyüme eğrisi oluşturulmuş ve büyüme parametrelerini araştırmak ve büyüme hızı optimizasyonu yoluyla erken senesensi indüklemek için optimal koşulları belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Bu eğri, popülasyon ikiye katlanma süresi, gecikme süresi ve doygunluk yoğunluğu gibi kritik metriklerin elde edilmesini kolaylaştırmış; bu veriler senesensi anlamak ve tetiklemek için çok önemli olmuştur (Şekil 3.1).

Hayflick ve Moorhead'in çalışmalarının ardından SC'ler için bir belirteç olarak ortaya çıkan beta-galaktosidaz boyaması, replikatif yaşlanmanın bir göstergesi olarak kritik bir rol oynamaktadır [57, 285]. Geleneksel olarak, in vitro fibroblast kültürleri, hızlı büyüme (IIa) evresinden yavaşlama (IIb) evresine geçtikten sonra, nihayetinde hücrelerin yaşlanma durumuna girdiği (III) evresine ulaşır [286]. Beta-galaktosidaz aktivitesinin pH 6'da bir yaşlanma biyomarkeri olarak kullanılması, çeşitli stres koşullarında yukarı düzenlenmesi nedeniyle tartışılmış olsa da, hücresel büyüme hızı ile güçlü korelasyonu birçok çalışmada doğrulanmıştır [287]. BJ fibroblast hücrelerinde H_2O_2 ile indüklenen erken yaşlanma deneysel modelimiz, replikatif senesensi en aza indiren bir zaman noktasının seçilmesini gerektirmiştir. Verilerimiz (Şekil 3.2, 3.3), SA-β-Gal aktivitesinde zamanla belirgin bir artış olduğunu göstermiştir, bu biyomarker hücresel yaşlanmanın geniş çapta kabul gören bir göstergesidir [288]. Gün 3'ten gün 9'a kadar olan ilerleme, BJ fibroblast hücrelerinin dış stres faktörleri olmadan içsel yaşlanma geçirdiğini göstermektedir (Şekil 3.2, 3.3). Oksidatif stres, özellikle IIa evresinden IIb evresine geçişten önce büyüme eğrisinin erken dönemlerinde uygulanmıştır.

Bir sonraki adım çalışmaları için H_2O_2'nin subletal doz aralığını belirlemek kritik olmuştur. Hücre canlılığı MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir [289]. BJ fibroblast hücrelerinin canlılığı, H_2O_2'ye doz bağımlı bir şekilde yanıt olarak azalmıştır (Şekil 3.4). Zhu ve arkadaşlarının önceki araştırmaları, subletal H_2O_2 konsantrasyonlarının (<300 μM) büyüme durmasını indükleyebileceğini ve insan diploid fibroblastlarının hayatta kalmasını olumsuz etkilemeden hücresel senesensi teşvik edebileceğini göstermiştir [290]. Sonuçlarımız, 100–600 μM H_2O_2 tedavisinin hücre canlılığı üzerinde önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir. Bir sonraki adımda, CA'nın BJ fibroblast hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerindeki etkisi MTT indirgeme testi kullanılarak değerlendirilmiştir [262]. Sonuçlarımız, CA'nın hücre canlılığı üzerindeki etkisinin konsantrasyon ve maruz kalma süresine bağlı olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 3.5). Önceki çalışmalarla tutarlı olarak, 1000 μM'ye kadar olan konsantrasyonların sitotoksik olmadığı not edilmiştir. Bulgularımız, CA'nın klinik veya araştırma ortamlarında hücre büyümesini toksisite olmadan modüle etme potansiyeline sahip olduğunu önermektedir.

Bu çalışmanın ana hedeflerinden biri SIPS için bir model oluşturmaktı. Oksi-enflam hipotezi, yaşla birlikte artan oksidatif stresin yaşlanmanın başlangıcına önemli ölçüde katkıda bulunduğunu önermektedir [291]. H_2O_2, çeşitli hücre tiplerinde oksidatif stresi indükleme rolüyle geniş çapta bilinmektedir [90]. ve minimum süreyle SIPS için subletal bir dozda kullanılmıştır.

Kumar ve arkadaşlarının bildirdiğine göre, subletal H_2O_2 konsantrasyonları ile tedavi, hücresel senesensi indüklemiştir (Şekil 3.6, 3.7) [292]. Bu bulgu, artan hücre büyüklüğü ve SASP geliştirme gibi tipik yaşlanma ile ilişkili özelliklerle kanıtlanmıştır. SIPS sonrası BJ fibroblast hücrelerinde CA tedavisinin etkisi vurgulanmıştır. CA'nın SA-β-Gal pozitif hücrelerinin sayısını azaltma kapasitesi, stres yanıtını düzenleme ve oksidatif hasar sonrası hücrelerin onarımına katkıda bulunma yeteneğini vurgulamaktadır (Şekil 3.6, 3.7). Senomorfik ajan metformin tedavisinin hücrelerde SA-β-gal aktivitesini azalttığı bildirilmiştir [293, 294]. Ayrıca, araştırma bulguları, kafeik asit, kuersetin ve resveratrol gibi biyoaktif bitki bileşiklerinin oksidatif stres kaynaklı senesensi iyileştirdiğini ve çeşitli hücre tiplerinde hücre proliferasyonunu teşvik ettiğini bulan önceki çalışmalarla tutarlıdır [295-297].

Sonuçlar, H_2O_2'ye maruz kalmanın hücre çekirdeğinin yapısını etkileyip etkilemediğini araştırmaya yönlendirmiştir. Bulgularımızla tutarlı olarak, Gerasymchuk ve arkadaşları, genç fibroblastların tipik olarak uzunlamasına, iğ şeklinde bir morfoloji sergilediğini ve kültür plakalarına güçlü bir şekilde yapıştığını bildirmişlerdir. Öte yandan, yaşlı fibroblastlar veya H_2O_2 ile tedavi edilenler, daha büyük, düzensiz şekilli ve daha az sıklıkta olma eğilimindedir [261]. Fibroblastlar, DNA dizilimlerinde yüksek adenin ve timin içeren bölgelere afinitesi olan bir floresan boya olan DAPI ile boyanmıştır [298]. Sadece H_2O_2'ye maruz bırakılan hücrelerde, çekirdekteki DAPI boyaması, kromatin kondensasyonu ve şekil değişiklikleri (çekirdek büyümesi veya düzensizlikler gibi) içeren daha fazla çekirdek atipisini göstermiştir. Bu değişiklikler, hücresel stres veya senescens işaret etmektedir [177, 299]. İlginç bir şekilde, CA tedavisi bu çekirdek değişikliklerini önemli ölçüde azaltmıştır. Bu bulgu, CA'nın oksidatif stres karşısında çekirdek bütünlüğünü ve stabilitesini koruma rolü oynayabileceğini düşündürmektedir (Şekil 3.8, 3.9). Ayrıca, hücrelerin lizozomal aktivitesini değerlendirmek için akridin turuncusu (AO) boyaması kullanılmıştır [300]. Bu aktivite, hücrenin hasarlı proteinleri ve organelleri geri dönüştürmeye çalıştığı senesens sırasında artabilir. AO ile boyanmış hücrelerin sayısı ve floresan yoğunluğu, H_2O_2 grubuna kıyasla CA ile tedavi edilen gruplarda daha düşük bulunmuştur, bu da CA'nın lizozomal aktivite ve DNA hasarı üzerindeki etkisini düşündürmektedir (Şekil 3.10, 3.11). Bulgularımızla tutarlı olarak, diğer araştırmacılar hücresel lizozomal içeriğin senesens sırasında arttığını göstermiştir [189]. In vitro senesens, lizozomal enzim seviyelerinin artışıyla ilişkilendirilmiştir [301]. Kurz ve arkadaşları, SC'lerin büyük olduğunu ve çok sayıda lizozomla dolu olduğunu bildirmiştir [302].

Alkalin comet testi tüm gruplarda DNA hasarını değerlendirmek için kullanılmıştır (Şekil 3.12). Kontrol, SIPS grubu ve CA tedavi grupları arasında nükleer hücrelerin büyüklüğünde farklılıklar gözlemlendi (Şekil 3.12, 3.13). Kontrol grubundaki hücreler düzenli, yuvarlak bir morfolojiye sahip, tek tip küçük nükleuslara sahipti. Öte yandan, SIPS grubunda hem küçük hem de büyük nükleusların karışımı ve nükleer şekil varyasyonları görüldü. Düzensiz bir floresan dağılımı, yaşlanmış kültürleri ayırt edici bir özellik olarak tanımlandı. CA ile tedavi edilen gruplar, doz bağımlı bir etki göstererek, nükleer morfolojiyi kontrol grubuna daha yakın bir

şekilde sergiledi. Bulgularımız literatürdeki çalışmalarla tutarlılık göstermektedir [303].

Oksidatif stresin, kritik hücresel bileşenler üzerinde birçok zararlı etkisinin olduğu ve lipid peroksidasyonu gibi durumlara yol açabileceği bilinmektedir. Bu durumlar, hücreyi serbest radikalleri nötralize etme kapasitesini bozar ve hücreyi yaşlanmaya sürükler. CA'nın oksidatif stres kaynaklı hücresel senesensi hafifletme ve tersine çevirme yeteneği araştırılırken, bu maddenin hücresel antioksidan savunma sistemlerini doz bağımlı bir şekilde artırdığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, hücresel H_2O_2 seviyelerindeki azalma (Şekil 3.14), MDA seviyelerindeki azalma (Şekil 3.15), GSH homeostazının korunması (Şekil 3.16) ve toplam SOD (T-SOD) aktivitesinde artış (Şekil 3.17) ile kanıtlanmıştır. Oksidatif stresin hücresel yaşlanmadaki rolü ve lipid peroksidasyonu ile bağlantısı Morliere ve arkadaşları [304] ile Lin ve arkadaşları [305] tarafından bildirilmiştir. Panieri ve arkadaşları, mitokondri kaynaklı H_2O_2'nin G1 fazı hücre döngüsü durdurmasına neden olduğunu, düşük düzeyde eksojen H_2O_2'nin ise G2/M fazında birikim oluşturduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, anti-mitokondriyal antikor tedavisi, pRB1'i benzersiz bir şekilde aktive etmiş ve p16 ile p21 seviyelerini artırmıştır; bu bulgu, mitokondriyal mekanizmaların ve hücre içi H_2O_2 seviyelerinin hücre döngüsü düzenlemesi ve DNA hasarı tepkisinde önemli roller oynadığını düşündürmektedir [306]. Zhang ve arkadaşları, genç (6 aylık) Sod1-/- farelerin böbreklerinde genç yaban türü (WT) farelere kıyasla SC seviyelerinin önemli ölçüde arttığını bildirmiştir [307]. Hayati bir antioksidan olan GSH dengesi, hücresel redoks homeostazının korunmasında da kritik öneme sahiptir. Yaşlanma süreci, genellikle artan oksidatif stres ve GSH döngüsü ile ilişkilidir. Bu hücresel yanıt, oksidatif durumu stabilize etmeye çalışır, bu da zamanla dengeyi yeniden sağlama konusunda yetersizlik veya verimlilikte azalmaya yol açabilir [308]. Oksidatif strese karşı CA'nın koruyucu etkileri ve antioksidan savunmayı sürdürmedeki rolü, onun yaşlanma karşıtı tedavide önemli bir bileşen olabileceğini göstermektedir. Sonuçlarımız, CA'nın fibroblastlar da dahil olmak üzere çeşitli hücre türlerinde yaşa bağlı işlevsel gerilemeyle mücadelede etkili bir bileşik olabileceğini göstermektedir.

RT-qPCR tekniği, gen ekspresyon analizinde altın standart olarak kabul edilir [309]. Bu tekniğin sonuçlarını doğru bir şekilde normalleştirebilmesi için güvenilir

referans genlere dayanması gerekir. Bu genlerin dikkatli bir şekilde seçilmesi kritik öneme sahiptir; bu genler iç kontroller olarak işlev görür ve hücre koşullarından bağımsız olarak sabit bir ekspresyona sahip olmalıdır. Bu kriterlere dayanarak, β-actin geni referans geni olarak kullanılmıştır. Kültüre alınmış hücreler genellikle çeşitli endojen ve ekzojen uyarıcılara maruz kalır ve bu durum, ana yaşlanma yollarının aktivasyonunda farklılıklara yol açar. Çok sayıda çalışma, hem in vitro hem de in vivo modeller kullanarak SC'lerin fenotipik ve transkripsiyonel heterojenliğini belgelemiştir [310]. Yaşlanmaya maruz kalan hücre tiplerinin çeşitliliği bu heterojenliği önemli ölçüde etkiler. Ayrıca, transkriptomik profil, yaşlanma sürecinin çeşitli aşamalarında farklı genlerin ekspresyonunu ortaya koyar. Bu bulgular, hücresel yaşlanmanın karmaşıklığını vurgulamakta ve yaşlanmanın ilerlemesi sırasında belirli gen ekspresyon değişikliklerinin zamanlamasına ve hücresel bağlama bağlı olarak dinamiklerinin nasıl değişebileceğini göstermektedir [311].

Senesens hücre bölünmesini ve büyüme durmasını hücre ölümü olmaksızın düzenleyen birbirine bağlı yolları içerir. Bu yollar, hayatta kalma, onarım mekanizmaları ve programlı hücre ölümünü dengelemektedir. Analiz edilen hedef genler, hücresel yaşlanma ile ilgili çeşitli yollara içkindir: pRB1, p53, p16 ve p21, RB ve p53 sinyal yolları aracılığıyla hücre döngüsü durmasını, yani yaşlanmanın ana özelliğini düzenler. Ayrıca, bu iki yol ile ilişkili pRB1, p16 ve p21 genleri protein seviyesinde de değerlendirilmiştir. Western blotting, proteinlerin immünolojik olarak tespiti için yaygın olarak kullanılan güçlü bir laboratuvar tekniğidir [312]. Bu teknik, yaşlanma belirteçlerinin protein seviyesinde ekspresyonunu doğrulamak için kullanılabilir. Son çalışmalar, p53/p21 ve p16/Rb yollarının yaşlanma üzerindeki rollerini incelemiştir [313, 314]. Choudhery'nin hücresel yaşlanma üzerine yaptığı araştırma, p21 ve p16'nın senesensi değerlendirmek için kilit biyomarkörler olduğunu ortaya koymuştur [315]. p21 ekspresyonu, p16 aşırı ekspresyonu, p21'in senesensi başlattığını, p16'nın ise bunu sürdürdüğünü göstermektedir. Bu bulgular, bu siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin hücresel yaşlanmada sırasıyla yer aldığını düşündürmektedir [316, 317]. Diğer çalışmalarda belirtildiği gibi, iki ana yaşlanma yolunun da aktive olduğu tespit edilmiştir: p53-p21 yolu (Şekil 3.22, 3.25) ve p16-pRB1 yolu (Şekil 3.23, 3.24) [313, 314]. ROS üretimi, p53/p21 sinyal yolunun aktivasyonunu tetikler [318].

Kamal ve arkadaşları, H_2O_2 tedavisinin p53 protein seviyesinde gecikmeli bir artışa neden olduğunu bildirmiştir. Yaşlanma sırasında, p53, siklin bağımlı kinaz inhibitörü (CDKi) p21'in transkripsiyonunu aktive eder [319]. Bu süreç, CDK2 aktivitesini inhibe eder ve bu da Rb'nin hipofosforilasyonuna yol açar ve hücre döngüsü durmasına neden olur [106].

Gen ekspresyonu ve p53 ile p21 protein seviyeleri, tedavi gruplarımız arasında önemli farklılıklar göstermiştir. H_2O_2 ile tedavi edilen grup, kontrol grubuna kıyasla p21 gen ekspresyonunda bir artış sergilemiştir. Protein seviyesinde de istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir(3.33). Bu bulgu, oksidatif strese yanıt olarak p21'in aktivasyonunu ve protein seviyesindeki sabit ekspresyonunu göstermektedir. Diğer yandan, 250 µM ve 500 µM CA tedavi grupları, H_2O_2 ile tedavi edilen gruba kıyasla daha düşük ekspresyon sergilemiştir. Bu bulgu, CA'nın SIPS'e karşı düzenleyici veya koruyucu bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir. p53 gen ekspresyonu da H_2O_2 ile tedavi edilen grupta kontrole kıyasla önemli ölçüde artmış ve bir stres yanıtını yansıtmıştır. 250 µM ve 500 µM CA gruplarında, H_2O_2 ile tedavi edilen gruba kıyasla p53 gen ekspresyonunda anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuç, kontrol grubuna benzer bir yanıtı göstermektedir. CA ile tedavi, hücre döngüsü durmasını ve hücrenin oksidatif stres yanıtını modüle edebilir.

p16 ve pRB1 gen ekspresyonu ve protein seviyeleri değerlendirildiğinde, tedavi grupları arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Özellikle H_2O_2 grubu, pRB1 gen ekspresyonu ve protein seviyelerinde (3.35) kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış sergilemiştir. H_2O_2 grubundaki p16 gen ekspresyon seviyesi, kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış göstermemiştir, ancak protein seviyesinde H_2O_2 ile tedavi edilen grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir (3.34). Bu gözlemler, p16 gen ekspresyon seviyeleri gruplar arasında benzer olmasına rağmen, post-transkripsiyonel düzenleme, protein stabilitesi, translasyon verimliliği, post-translasyonel modifikasyon [320] ve hücresel içerik [321] gibi çeşitli faktörlerin protein seviyelerinde önemli farklılıklara katkıda bulunabileceğini vurgulamaktadır. 250 µM ve 500 µM CA gruplarında, H_2O_2 ile tedavi edilen gruba kıyasla pRB1 ve p16 gen ekspresyonlarında önemli bir azalma gözlenmiştir. Bu gözlemler, pRB1 ve p16 gen ekspresyonu ve protein seviyelerinin gruplar arasında önemli farklılıklar

gösterdiğini ve CA'nın yaşlanma düzenleyici pRB1 ve p16 proteinlerinin ekspresyon seviyelerini doz bağımlı olarak azaltmaya katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, deneyimizin spesifik koşullarının, hücresel yaşlanmaya katkıda bulunan birden fazla mekanizmayı eşzamanlı olarak aktive ettiğini ve çevresel faktörlerin yaşlanmanın düzenlenmesini nasıl etkileyebileceğini vurgulamaktadır.

Hücresel senesens'in bir diğer önemli yönü, DNA onarım mekanizmalarını içerir. Sirtuin 1 (SIRT1) ve Poli (ADP-riboz) Polimeraz-1 (PARP1), sırasıyla Sirtuin (SIRT) ve Poly ADP-Riboz Polimeraz (PARP) yollarının bir parçası olan DNA onarım mekanizmalarıdır [322]. Sirtuin 1, transkripsiyon faktörlerini ve histonları deasetile ederek birçok hücresel fonksiyonu değiştiren önemli bir enzimdir. İnflamasyon, yaşlanma, stres direnci ve mitokondriyal biyogenez üzerinde etkili olur. SIRT1 aktivitesi, kronik inflamasyon ve yaşlanma koşullarında, oksidatif stresin yaygın olduğu durumlarda azalır. Bu azalma, dış etkenler tarafından neden olunan oksidatif modifikasyonlar da dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlı olarak gerçekleşir ve bu da onun inaktivasyonuna ve parçalanmasına yol açar [323-327]. PARP1, belirli DNA onarım süreçlerinin düzenlenmesinde, genomun stabilitesinin sağlanmasında ve hücre hayatta kalmasının teşvik edilmesinde kritik bir rol oynayan çok yönlü bir enzimdir. PARP aktivitesi olmayan farelerin doğurgan olduğu ve belirgin bir sağlık sorunu olmadığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, radyasyona maruz kalmanın in vitro olarak primer embriyonik fibroblastların çoğalma hızını azalttığı ve in vivo olarak timositlerin çoğalmasını geciktirdiği gözlenmiştir [207]. CA'nın, yaşlanma ile ilişkili anahtar moleküler yolları etkilediği kesin olarak gösterilmiştir. Özellikle, 500 μM CA, kontrol ve H_2O_2 ile tedavi edilen gruplara kıyasla SIRT1 gen ekspresyonunu önemli ölçüde artırmıştır (Şekil 3.26). Bu SIRT1 ekspresyon artışı, yaşlanmaya ve ilişkili hücresel hasara karşı daha dirençli bir hücresel ortamı teşvik eder. Ek olarak, PARP1 gen ekspresyon seviyeleri tüm gruplarda tutarlı kalmıştır. Bu bulgu, PARP1 aktivasyonunu gerektirecek düzeyde DNA hasarına neden olunmadığını göstermektedir. Aynı zamanda, CA'nın etkilerinin yaşlanma ile ilişkili spesifik yollar üzerinde seçici bir şekilde odaklanabileceğini de düşündürmektedir (Şekil 3.27).

Ayrıca, APEX1, Baz Eksizyon Onarım (BER) yolunun bir parçasıdır ve ağırlıklı olarak DNA onarımına yardımcı olur ve transkripsiyonu kontrol eden redoks

faktörlerini düzenler [328]. Gen ekspresyon sonuçlarımıza göre, özellikle 500 µM CA uygulaması, kontrol ve 250 µM gruplarına kıyasla APEX1 gen ekspresyonunu önemli ölçüde artırmıştır. Aynı zamanda, H_2O_2 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Bu bulgu, CA'nın DNA onarım mekanizmalarını potansiyel olarak artırabileceğini göstermektedir (Şekil 3.28). Bulgularımızla uyumlu olarak, araştırmacılar neomisin direnç kaseti kullanarak daha düşük APEX1 seviyelerine sahip hipomorfik bir fare modeli de oluşturmuşlardır. Bu yavrular daha küçük olup, düşük APEX1 seviyeleri, şekilsiz kuyruklar ve artan oksidatif DNA hasarı sergilemişlerdir. Bu bulgular, APE1'in gelişim ve DNA korumasındaki kritik rolünü vurgulamaktadır [329].

Nrf2 Antioksidan Yanıt Yolu, hücrelerin oksidatif strese tepkisini düzenler [330]. Nrf2, ROS'u süpüren proteinlerin ve antioksidan enzimlerin üretimini artırabileceği için, ömür sinyalleme yollarında önemli bir unsur olarak kabul edilir [331]. Nrf2'nin baskılanması, hücresel senesensi önemli ölçüde hızlandırır ve Nrf2'nin yaşlanmaya karşı koruma sağlamadaki önemini vurgular [332]. Çalışmamızda, H_2O_2 kaynaklı yaşlanmaya maruz kalan hücrelerde Nrf2 gen ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde değişmediği gösterilmiştir. Bu yaşlanma koşulları altında, CA ile tedavi, Nrf2 gen ekspresyon seviyesini kontrol ve H_2O_2 gruplarına kıyasla doz bağımlı olarak artırmıştır. Bu bulgu, CA'nın Nrf2 ekspresyonunu iyileştirdiğini göstermektedir (Şekil 3.29). Nrf2 bağımlı antioksidan savunma sisteminin aktivasyonu, senesensi etkili bir şekilde önler [333].

AMPK yolu, hücresel enerji homeostazını düzenler [334]. AMPK'nin aktivasyonu, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin (örneğin, SIRT1, FoxO/DAF-16 ve NRF2) eylemlerini kontrol edebilir ve vücudun stresle başa çıkma yeteneğini potansiyel olarak artırabilir [334]. AMPK gen ekspresyon seviyeleri değerlendirildiğinde, H_2O_2 grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. 500 µM CA grubu, H_2O_2 grubuna kıyasla AMPK ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir. 500 µM CA tedavi dozunun, BJ fibroblast hücrelerinde AMPK-SIRT1-Nrf2 eksenini aktive ederek metabolik sistemin yaşlanmış hücrelere yanıtını iyileştirdiği bulunmuştur (Şekil 3.30). Araştırma bulgularına benzer şekilde, Khairnar ve ark. in vivo Nefrotoksisite çalışmasında şelidonik asidin AMPK seviyelerini artırdığını bildirmiştir [282]. Önceki araştırmalar, metformin'in AMPK'yi aktive ederek ve insan lens epitel

hücrelerinde otofajiyi artırarak oksidatif stres kaynaklı senesensi hafifletebileceğini göstermiştir [335]. Son yapılan bir çalışma, AICAR'ın AMPK'yi aktive ettiğinde, retinoblastoma hücrelerinde p21 ekspresyonunu düşürdüğünü bulmuştur [336]. Hücre döngüsü inhibe edilmesine rağmen, AICAR uygulanması myoblast hücrelerinde p21 seviyelerini azaltmıştır [337]. Gao ve arkadaşları, AMPK'nın SIRT1 aracılığıyla düzenleme yoluyla NF-κB aracılı enflamatuar yanıtları etkilediğini bildirmiştir [338]. SIRT1 ve AMPK'nin birbirlerini karşılıklı olarak kontrol ettiği gösterilmiştir [339]. Bu proteinlerin aktivasyonunun azalmasının önemli hücresel strese yol açabileceği önerilmiştir. Bu durum, hücresel bakım için enerji metabolizmasını kısıtlayarak ve mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve inflamasyona yol açarak gerçekleşebilir [340].

Sitokrom c (CytC), iç mitokondriyal zarın dış yüzeyinde bulunan, yaygın olarak tanınan bir hem içerikli proteindir. CytC, oksidatif stresin önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilir; peroksidaz benzeri aktivite sergiler [341]. Ayrıca, programlanmış hücre ölümüne yol açan bir olaylar zincirini başlatır [342]. CytC ve Bax, İçsel Apoptotik Yolağın apoptotik mekanizmasının kritik bileşenleridir [343]. Bcl-2, bir anti-apoptotik protein olup, Bax'ın pro-apoptotik etkilerini heterodimerler oluşturarak inhibe edebilir ve böylece Bax'ın apoptozu tetiklemesini engeller [344]. Bununla birlikte, Bcl-2 seviyeleri Bax ile aynı oranda artmazsa, Bcl-2'nin inhibitör etkilerini geçersiz kılabilir. Bax ve Bcl-2 arasındaki denge, bir hücrenin apoptoz geçirip geçirmeyeceğini belirlemede kritik öneme sahiptir [345]. Bu çalışmada, yalnızca H_2O_2 ile tedavi edilen hücreler, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha düşük Bax seviyeleri göstermiş ve bu durum hücre döngüsü durmasına yol açmıştır (Şekil 3.31). Ayrıca, artan hücre içi H_2O_2 seviyeleri, muhtemelen artan peroksidaz aktivitesi nedeniyle CytC ekspresyonunun artmasına katkıda bulunmuştur. Diğer yandan, H_2O_2'ye maruz kaldıktan sonra 500 µM CA ile tedavi edilen hücreler, önemli ölçüde artmış Bax seviyeleri ve CytC seviyelerinde H_2O_2 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir ve bu durum seçici apoptozu işaret etmektedir (Şekil 3.32). Bu yanıt, CA'nın bu dozajda senolitik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir; ilk senolitikler, SC'lerin programlanmış hücre ölümünden kaçma yeteneğini, esas olarak anti-apoptotik B-hücre lenfoma 2 (Bcl-2) ailesi proteinlerini inhibe ederek engelledi [346]. CA'nın Bax'ı yukarı düzenleme yeteneği ve hasar görmüş SC'lerde potansiyel olarak apoptozu teşvik

ederken, aynı zamanda mitokondrileri stabilize etmek ve gereksiz hücre ölümünü en aza indirmek için CytC'yi azaltma yeteneği, onun yaşlanma araştırmalarındaki terapötik potansiyelini vurgulamaktadır. Bu çift mekanizma, hücresel hayatta kalma ve apoptoz yolları arasındaki karmaşık dengeyi vurgulamakta ve CA'yı hücresel senesensi yönetmek ve potansiyel olarak tersine çevirmek için umut verici bir terapötik ajan olarak konumlandırmaktadır.

Literatürde senesens ile ilgili yapılmış olan in vivo çalışmalar incelendiğinde, D-galaktoz oksidatif stres ajanı olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur [347]. Farklı dozlarda D-galaktoz ile indüklenen senesens in vivo model çalışmalarında D-galaktoz gruplarına uygulanan NOR testi kontrol veya tedavi gruplarına kıyasla daha düşük tanıma indeksleri sergilediğini göstermiştir. Örneğin, Sun ve arkadaşları, ICR farelerinde 6 hafta boyunca subkutan enjeksiyonlarla 150 mg/kg uygulanan D-galaktoz grubunun NOR testinde kontrol grubuna kıyasla tanıma indeksinde bir azalma olduğunu bildirmiştir [256]. Çalışmamızda, doğal senesensi taklit etmek için kullandığımız D-gal, öğrenmeyi bozmuş ve NOR testinde ayırt etme indeksini (nesneleri ayırt etme yeteneği puanı) 0'ın altına düşürmüştür. Yapılan bir çalışmalarda, D-galaktoz uygulaması, oksidatif strese bağlı olarak senesensi tetiklemekte ve bellek bozulmasına sebep olmaktadır . D-gal uygulamasının nörotoksisiteye sebep olduğu bildirilmiştir [348]. Ayrıca, uzun süreli hafıza değerlendirmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen, D-gal grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ayırt etme indeksinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir. bu sonuç in vivo oksidatif strese bağlı senesens deney modelinin başarılı bir şekilde indüklendiğini göstermektedir.

Kısa Süreli Tanıma İndeksi:

Grafikteki sonuçlara göre, CA uygulanan grup, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bir ayırt etme indeksi sergilemiştir. Bu durum, CA'nın hafızayı kısa vadede olumlu etkilediğini ve nesneleri tanıma yeteneğini geliştirdiğini göstermektedir. Ancak, D-galaktoz + CA (D-gal + CA) grubuna bakıldığında, bu grubun ayırt etme indeksinin hem kontrol hem de CA gruplarından daha düşük olduğu görülmüştür. Buna rağmen, D-galaktoz grubuyla karşılaştırıldığında, D-gal + CA grubunda iyileşme gözlemlenmiştir. Bu, CA'nın, D-galaktoz ile indüklenen yaşlanma modelinde hafızayı koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini işaret etmektedir, ancak

CA tedavisinin, D-gal grubu ile karşılaştırıldığında etkisinin sınırlı kalabileceği gözlenmiştir (Şekil 3.37).

Uzun Süreli Tanıma İndeksi:

Uzun süreli hafıza grafiğinde ise, D-gal + CA grubunda ayırt etme indeksinin D-gal grubuna kıyasla belirgin şekilde daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu, CA'nın görsel hafızayı destekleme potansiyeline sahip olduğunu ve özellikle oksidatif stres veya yaşlanma gibi koşullar altında hafızayı koruyucu bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, D-gal grubuna kıyasla CA uygulanan grupta da uzun süreli hafızanın olumlu yönde etkilendiği anlaşılmaktadır (Şekil 3.38).

CA, özellikle D-galaktoz ile indüklenen yaşlanma modelinde, kısa ve uzun süreli hafıza fonksiyonlarını iyileştirici bir etkiye sahip olabilir. Kısa süreli hafızada CA'nın etkisi belirgin olsa da, yaşlanma modeli ile oluşturulan stres durumlarında bu etkinin tam olarak ortaya çıkmadığı görülmektedir. Bununla birlikte, uzun süreli hafızada CA'nın hafızayı destekleme potansiyeli daha güçlü görünmektedir. D-gal + CA grubunda gözlemlenen bu iyileşme, CA'nın oksidatif stres ve hücresel yaşlanmaya karşı koruyucu bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

CA ve D-gal + CA gruplarını incelediğimizde, kısa süreli hafızada, CA grubunda ayırt etme indeksi C grubundan daha yüksek, D-gal + CA grubunda ise hem C hem de CA gruplarından daha düşük, ancak D-gal grubundan daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, uzun süreli hafıza incelendiğinde, D-gal + CA grubunda daha yüksek bir ayırt etme indeksi gözlemlenmiş ve bu da CA'nın görsel hafızayı destekleme potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir.

- Öneriler

Kısa süreli H_2O_2 tedavisi, oksidatif stresi indüklemek ve hücresel senesensi hızlandırmak için yerleşik ve yaygın olarak kullanılan bir deneysel modeldir. Ancak, bu modelin, doğal olarak uzun bir süre boyunca kademeli olarak meydana gelen yaşlanma sürecini tam olarak taklit etmediği bilinmektedir. Spontan yaşlanma, kümülatif hasar, telomer kısalması ve çeşitli stres etmenlerinin neden olduğu DNA hasarı yanıt yollarının kronik aktivasyonuna karşı hücresel bir stres yanıtıdır. Bu stres etmenleri ve sonuç olarak ortaya çıkan fenotipler, H_2O_2'nin indüklediği akut oksidatif stres ile tam olarak yansıtılmayabilir. Bu sınırlama,

yaşlanmanın daha yavaş geliştiği daha karmaşık biyolojik sistemlerde bulguların uygulanabilirliğini etkileyebilir. Bununla birlikte, bu model, oksidatif strese yanıt olarak spesifik moleküler ve hücresel mekanizmaların çalışılmasını kolaylaştırarak, yaşlanmanın kontrollü ve tekrarlanabilir bir şekilde indüklenmesine olanak tanır. Bu modelden elde edilen bilgiler, yaşlanmanın erken evresinin anlaşılması ve Şelidonik asidin stres kaynaklı hücresel senesensi hafifletme ve tersine çevirme üzerindeki potansiyel terapötik etkilerinin anlaşılması açısından değerlidir.

Çalışmamız, Şelidonik asidin hücresel senesens ile ilişkili birkaç kritik yolu düzenlediğini ve özellikle oksidatif stres belirteçlerini azaltarak ve BJ fibroblast hücrelerinde senensens ile ilişkili fenotiplerin ilerlemesini engelleyip tersine çevirerek senesensi hafiflettiğini ortaya koymuştur. Bu bileşik, yalnızca SA-βgal aktivitesini azaltmakla kalmamış, aynı zamanda oksidatif stres belirteçlerini (MDA gibi) etkin bir şekilde azaltmış ve SOD ve GSH aktivitelerini artırarak antioksidan savunmalarını iyileştirmiştir. Gen ekspresyonu ve protein seviyeleri çalışmalarımız, CA'nın yaşlanma sinyal yollarında önemli roller oynayan proteinlerle güçlü etkileşimler gösterdiğini ve CA'nın senesensi kolaylaştıran hücresel mekanizmalara müdahale edebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, gen ekspresyonu ve protein analiz verilerimiz arasındaki tutarlılık, CA'nın oksidatif stresin etkilerini azaltan bir "senomorfik" ajan olarak işlev görebileceği fikrini desteklemektedir. Bu bulgu, SA-β-Gal pozitif hücrelerdeki azalmalar ve yaşlanma ile ilişkili gen ekspresyonu ve protein seviyelerindeki değişikliklerle kanıtlanmaktadır. Ek olarak, CA in vitro ortamda olası senolitik aktivite göstermekte olup, hücresel yaşlanma ve oksidatif stres yollarını etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Bu bileşiğin hücresel belirteçler ve hücresel mikroçevre üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, senesens ve oksidatif stresle ilişkili durumların yönetiminde tıbbi ve kozmetik uygulamalarda önemli bir potansiyele sahiptir. Tıbbi uygulamalarda, CA, oksidatif stresin şiddetlendirdiği yaşa bağlı hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif bozukluklar gibi durumların tedavisinde potansiyel göstermektedir. Dasatinib, Quercetin ve Navitoclax gibi senolitik ajanlar ile Metformin, Rapamycin ve Resveratrol gibi senomorfik ajanlarla karşılaştırıldığında, CA'nın benzer etki mekanizmaları ile çift yönlü senomorfik ve senolitik potansiyele sahip olması, tamamlayıcı faydalar

sunabileceğini göstermektedir. Kozmetik uygulamalarda ise, CA, cilt elastikiyeti, nemlendirme, cilt yenilenmesi ve kırışıklık giderme gibi anti-yaşlanma etkileri için harici cilt bileşimlerinde aktif bir bileşen olarak kullanılabilir. CA, etkinliğini artırmak ve kozmetik formülasyonlarda uygulama alanını genişletmek için kolajen ve hyaluronik asit gibi çeşitli aktif bileşiklerle birleştirilebilir. Küçük piron halkası ve düşük toksik etkisi gibi özellikleri, CA'nın transdermal olarak etkili dozlarda emilmesini ve düşük yan etkileri nedeniyle kozmetik uygulamalarda etkin bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır. Bu çalışmanın umut verici sonuçları, CA'nın mekanizmalarının ve etkinliğinin kapsamlı bir senesens ile ilgili bağlamda doğrulanması ve daha iyi anlaşılması için uzun vadeli in vitro çalışmaların ve in vivo araştırmaların yapılmasını teşvik etmektedir. CA'nın antioksidan Resveratrol, anti-enflamatuar Kannabinoidler ve nemlendirici etkili Retinoller gibi yeni kozmetik bileşenlerle karşılaştırılması için daha fazla araştırma gerekmektedir. Gelecekteki araştırmalar, CA'nın klinik ortamlarda pratik uygulamasını artırmak için biyoyararlanımını ve iletim mekanizmalarını iyileştirmeye odaklanmalıdır.

KAYNAKÇA

[1] D. Harman, "The aging process," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 78, no. 11, pp. 7124-7128, 1981.

[2] R. R. Kohn, "Aging and age-related diseases normal processes," *Aging (New York),* vol. 28, pp. 1-44, 1985.

[3] N. Shock, C. Finch, and L. Hayflick, "Handbook of the Biology of Aging," *System integration. In: Finch CE, Hayflick L, Editors. New York,* pp. 639-665, 1977.

[4] S. Song, E. W.-F. Lam, T. Tchkonia, J. L. Kirkland, and Y. Sun, "Senescent cells: emerging targets for human aging and age-related diseases," *Trends in biochemical sciences,* vol. 45, no. 7, pp. 578-592, 2020.

[5] M. J. Jones, S. J. Goodman, and M. S. Kobor, "DNA methylation and healthy human aging," *Aging cell,* vol. 14, no. 6, pp. 924-932, 2015.

[6] L. Peretz and N. Rappoport, "Deviation of physiological from chronological age is associated with health," in *Challenges of Trustable AI and Added-Value on Health*: IOS Press, 2022, pp. 224-228.

[7] M. Yu, W. D. Hazelton, G. E. Luebeck, and W. M. Grady, "Epigenetic Aging: More Than Just a Clock When It Comes to CancerEpigenetic Aging in Cancer," *Cancer research,* vol. 80, no. 3, pp. 367-374, 2020.

[8] F. Gurău *et al.*, "Anti-senescence compounds: a potential nutraceutical approach to healthy aging," *Ageing Research Reviews,* vol. 46, pp. 14-31, 2018.

[9] A. E. Field, N. A. Robertson, T. Wang, A. Havas, T. Ideker, and P. D. Adams, "DNA methylation clocks in aging: categories, causes, and consequences," *Molecular cell,* vol. 71, no. 6, pp. 882-895, 2018.

[10] T. Von Zglinicki, "Oxidative stress shortens telomeres," *Trends in biochemical sciences,* vol. 27, no. 7, pp. 339-344, 2002.

[11] C. J. Schmidlin, M. B. Dodson, L. Madhavan, and D. D. Zhang, "Redox regulation by NRF2 in aging and disease," *Free Radical Biology and Medicine,* vol. 134, pp. 702-707, 2019.

[12] F. Hussain and H. U. R. Kayani, "Aging-Oxidative stress, antioxidants and computational modeling," *Heliyon,* vol. 6, no. 5, 2020.

[13] T. A. F. Aguilar, B. C. H. Navarro, and J. A. M. Pérez, "Endogenous antioxidants: a review of their role in oxidative stress," *A master regulator of oxidative stress-the transcription factor nrf2,* pp. 3-20, 2016.

[14] E. H. Blackburn, "Switching and signaling at the telomere," *Cell,* vol. 106, no. 6, pp. 661-673, 2001.

[15] M. A. Blasco, "Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond," *Nature Reviews Genetics,* vol. 6, no. 8, pp. 611-622, 2005.

[16] E. H. Blackburn, C. W. Greider, and J. W. Szostak, "Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging," *Nature medicine,* vol. 12, no. 10, pp. 1133-1138, 2006.

[17] A. Aviv, "Genetics of leukocyte telomere length and its role in atherosclerosis," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,* vol. 730, no. 1-2, pp. 68-74, 2012.

[18] J. D. Erusalimsky and D. J. Kurz, "Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease," *Experimental gerontology,* vol. 40, no. 8-9, pp. 634-642, 2005.

[19] T. Von Zglinicki, G. Saretzki, J. Ladhoff, F. d. A. di Fagagna, and S. Jackson, "Human cell senescence as a DNA damage response," *Mechanisms of ageing and development,* vol. 126, no. 1, pp. 111-117, 2005.

[20] J. Campisi, "Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective," *Current opinion in genetics & development,* vol. 21, no. 1, pp. 107-112, 2011.

[21] F. Rodier *et al.*, "DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion," *Journal of cell science,* vol. 124, no. 1, pp. 68-81, 2011.

[22] M. Fumagalli *et al.*, "Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation," *Nature cell biology,* vol. 14, no. 4, pp. 355-365, 2012.

[23] I. Sidorov, M. Kimura, A. Yashin, and A. Aviv, "Leukocyte telomere dynamics and human hematopoietic stem cell kinetics during somatic growth," *Experimental hematology,* vol. 37, no. 4, pp. 514-524, 2009.

[24] M. Kimura, Y. Gazitt, X. Cao, X. Zhao, P. M. Lansdorp, and A. Aviv, "Synchrony of telomere length among hematopoietic cells," *Experimental hematology,* vol. 38, no. 10, pp. 854-859, 2010.

[25] D. V. Ziegler, C. D. Wiley, and M. C. Velarde, "Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging," *Aging cell,* vol. 14, no. 1, pp. 1-7, 2015.

[26] D. J. Baker *et al.*, "Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders," *Nature,* vol. 479, no. 7372, pp. 232-236, 2011.

[27] A. Lechel *et al.*, "The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis in vivo," *EMBO reports,* vol. 6, no. 3, pp. 275-281, 2005.

[28] A. V. Budanov, "The role of tumor suppressor p53 in the antioxidant defense and metabolism," *Mutant p53 and MDM2 in Cancer,* pp. 337-358, 2014.

[29] Y. Y. Sanders *et al.*, "Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress," *Redox biology,* vol. 1, no. 1, pp. 8-16, 2013.

[30] K. Tominaga, "The emerging role of senescent cells in tissue homeostasis and pathophysiology," *Pathobiology of Aging & Age-Related Diseases,* vol. 5, no. 1, p. 27743, 2015.

[31] C. Correia-Melo and J. F. Passos, "Mitochondria: are they causal players in cellular senescence?," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics,* vol. 1847, no. 11, pp. 1373-1379, 2015.

[32] P. Davalli, T. Mitic, A. Caporali, A. Lauriola, and D. D'Arca, "ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases," *Oxidative medicine and cellular longevity,* vol. 2016, 2016, doi: https://doi.org/10.1155/2016/3565127.

[33] S. Sharma and A. Johri, "Hormones Responsible for Aging in Humans," ed, 2021.

[34] J. W. Błaszczyk, "Energy metabolism decline in the aging brain—pathogenesis of neurodegenerative disorders," *Metabolites,* vol. 10, no. 11, p. 450, 2020.

[35] A. Bartke, S. Brannan, E. Hascup, K. Hascup, and J. Darcy, "Energy metabolism and aging," *The World Journal of Men's Health,* vol. 39, no. 2, p. 222, 2021.

[36] A. Kammeyer and R. Luiten, "Oxidation events and skin aging," *Ageing research reviews,* vol. 21, pp. 16-29, 2015.

[37] M. Wlaschek *et al.*, "Solar UV irradiation and dermal photoaging," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology,* vol. 63, no. 1-3, pp. 41-51, 2001.

[38] M. A. Birch-Machin and H. Swalwell, "How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue," *Mutagenesis,* vol. 25, no. 2, pp. 101-107, 2010.

[39] L. Baumann, "Skin ageing and its treatment," *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland,* vol. 211, no. 2, pp. 241-251, 2007.

[40] T. Niccoli and L. Partridge, "Ageing as a risk factor for disease," *Current biology,* vol. 22, no. 17, pp. R741-R752, 2012.

[41] C. f. D. Control and Prevention, "Current cigarette smoking among adults-United States, 2011," *MMWR: Morbidity & Mortality Weekly Report,* vol. 61, no. 44, 2012.

[42] Y.-H. Leow and H. I. Maibach, "Cigarette smoking, cutaneous vasculature, and tissue oxygen," *Clinics in dermatology,* vol. 16, no. 5, pp. 579-584, 1998.

[43] F. C. Malcomson and J. C. Mathers, "Nutrition and ageing," *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part I Biomedical Science,* pp. 373-424, 2018.

[44] T. D. Gilmore, "Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives," *Oncogene,* vol. 25, no. 51, pp. 6680-6684, 2006.

[45] A. Bierhaus *et al.*, "A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 100, no. 4, pp. 1920-1925, 2003.

[46] K. De Bosscher, W. Vanden Berghe, and G. Haegeman, "The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-κB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression," *Endocrine reviews,* vol. 24, no. 4, pp. 488-522, 2003.

[47] A. S. Adler, S. Sinha, T. L. Kawahara, J. Y. Zhang, E. Segal, and H. Y. Chang, "Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-κB activity," *Genes & development,* vol. 21, no. 24, pp. 3244-3257, 2007.

[48] V. D. Longo and B. K. Kennedy, "Sirtuins in aging and age-related disease," *Cell,* vol. 126, no. 2, pp. 257-268, 2006.

[49] A. S. Adler, T. L. Kawahara, E. Segal, and H. Y. Chang, "Reversal of aging by NFκB blockade," *Cell cycle,* vol. 7, no. 5, pp. 556-559, 2008.

[50] M. S. Lipsky and M. King, "Biological theories of aging," *Disease-a-month,* vol. 61, no. 11, pp. 460-466, 2015.

[51] H. K. Kamel, A. D. Mooradian, and T. Mir, "Biological theories of aging," *Endocrinology of aging,* pp. 1-9, 2000.

[52] B. T. Weinert and P. S. Timiras, "Invited review: Theories of aging," *Journal of applied physiology,* vol. 95, no. 4, pp. 1706-1716, 2003.

[53] R. C. Allsopp *et al.*, "Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 89, no. 21, pp. 10114-10118, 1992.

[54] B. McClintock, "Genetics26, 234-282," *McClintock23426Genetics1941,* 1941.

[55] T. L. Orr-Weaver, J. W. Szostak, and R. J. Rothstein, "Yeast transformation: a model system for the study of recombination," *Proceedings of the national Academy of Sciences,* vol. 78, no. 10, pp. 6354-6358, 1981.

[56] J. E. Haber and P. C. Thorburn, "Healing of broken linear dicentric chromosomes in yeast," *Genetics,* vol. 106, no. 2, pp. 207-226, 1984.

[57] L. Hayflick, "The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains," *Experimental cell research,* vol. 37, no. 3, pp. 614-636, 1965.

[58] Y. Higami and I. Shimokawa, "Apoptosis in the aging process," *Cell and tissue research,* vol. 301, pp. 125-132, 2000.

[59] D. Monti *et al.*, "Apoptosis—programmed cell death: a role in the aging process?," *The American journal of clinical nutrition,* vol. 55, no. 6, pp. 1208S-1214S, 1992.

[60] E. Cornelius, "Increased incidence of lymphomas in thymectomized mice-evidence for an immunological theory of aging," *Experientia,* vol. 28, no. 4, pp. 459-459, 1972.

[61] A. J. Rozemuller, W. A. van Gool, and P. Eikelenboom, "The neuroinflammatory response in plaques and amyloid angiopathy in

Alzheimer's disease: therapeutic implications," *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders,* vol. 4, no. 3, pp. 223-233, 2005.

[62] R. Sohal and R. Allen, "Relationship between metabolic rate, free radicals, differentiation and aging: a unified theory," *Molecular biology of aging,* pp. 75-104, 1985.

[63] D. Amador-Noguez, K. Yagi, S. Venable, and G. Darlington, "Gene expression profile of long-lived Ames dwarf mice and Little mice," *Aging cell,* vol. 3, no. 6, pp. 423-441, 2004.

[64] L. Demetrius, "Caloric restriction, metabolic rate, and entropy," *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences,* vol. 59, no. 9, pp. B902-B915, 2004.

[65] D. Rudman, M. Kutner, C. Rogers, M. Lubin, G. Fleming, and R. Bain, "Impaired growth hormone secretion in the adult population: relation to age and adiposity," *The Journal of clinical investigation,* vol. 67, no. 5, pp. 1361-1369, 1981.

[66] H. Bando, C. Zhang, Y. Takada, R. Yamasaki, and S. Saito, "Impaired secretion of growth hormone-releasing hormone, growth hormone and IGF-I in elderly men," *European Journal of Endocrinology,* vol. 124, no. 1, pp. 31-36, 1991.

[67] A. Iranmanesh, G. Lizarralde, and J. D. Veldhuis, "Age and relative adiposity are specific negative determinants of the frequency and amplitude of growth hormone (GH) secretory bursts and the half-life of endogenous GH in healthy men," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* vol. 73, no. 5, pp. 1081-1088, 1991.

[68] F. Waldhauser *et al.*, "Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* vol. 66, no. 3, pp. 648-652, 1988.

[69] F. Waldhauser, J. Ková, and E. Reiter, "Age-related changes in melatonin levels in humans and its potential consequences for sleep disorders," *Experimental gerontology,* vol. 33, no. 7-8, pp. 759-772, 1998.

[70] M. Langer, J. Hartmann, H. Turkof, and F. Waldhauser, "Melatonin in the human--an overview," *Wiener klinische Wochenschrift,* vol. 109, no. 18, pp. 707-713, 1997.

[71] R. Wiener, R. D. Utiger, R. Lew, and C. H. Emerson, "Age, sex, and serum thyrotropin concentrations in primary hypothyroidism," *European Journal of Endocrinology,* vol. 124, no. 4, pp. 364-369, 1991.

[72] F. Bermudez, M. I. Surks, and J. H. Oppenheimer, "High incidence of decreased serum triiodothyronine concentration in patients with nonthyroidal disease," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* vol. 41, no. 1, pp. 27-40, 1975.

[73] R.-D. Hesch, J. Gatz, H. Jüppner, and P. Stubbe, "TBG-dependency of age related variations of thyroxine and triiodothyronine," *Hormone and Metabolic Research,* vol. 9, no. 02, pp. 141-146, 1977.

[74] J. Herrmann, E. Heinen, H. Kröll, K. Rudorff, and H. Krüskemper, "Thyroid function and thyroid hormone metabolism in elderly people. Low T3-

syndrome in old age?," *Klinische Wochenschrift,* vol. 59, no. 7, pp. 315-323, 1981.

[75] M. Djordjević, N. Paunković, and V. Djordjević-Lalosević, "The effect of age on in vitro thyroid function tests in adult patients on a chronic hemodialysis program," *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo,* vol. 118, no. 7-8, pp. 291-293, 1990.

[76] S. W. Spaulding, "Age and the Thyrood," *Endocrinology and metabolism clinics of North America,* vol. 16, no. 4, pp. 1013-1025, 1987.

[77] J. Smeulers, T. Visser, A. Burger, R. Docter, and G. Hennemann, "Decreased triiodothyronine (T3) production in constant reverse T3 production in advanced age," *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde,* vol. 123, no. 1, pp. 12-15, 1979.

[78] E. Bucht, H. Rong, H.-E. Sjöberg, U. Sjöstedt, B. Granberg, and O. Tørring, "Serum calcitonin forms and concentrations in young and elderly healthy females," *Calcified tissue international,* vol. 56, pp. 32-37, 1995.

[79] M. Pedrazzoni, M. Mantovani, G. Ciotti, G. Girasole, G. Pioli, and E. Palummeri, "Calcitonin levels in normal women of various ages evaluated with a new sensitive radioimmunoassay," *Hormone and metabolic research,* vol. 20, no. 02, pp. 118-119, 1988.

[80] N. ORENTREICH, J. L. BRIND, R. L. RIZER, and J. H. VOGELMAN, "Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* vol. 59, no. 3, pp. 551-555, 1984.

[81] N. Orentreich, J. L. Brind, J. H. Vogelman, R. Andres, and H. Baldwin, "Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in normal men," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* vol. 75, no. 4, pp. 1002-1004, 1992.

[82] R. Hegstad *et al.*, "Aging and aldosterone," *The American journal of medicine,* vol. 74, no. 3, pp. 442-448, 1983.

[83] S. Khosla, L. J. Melton III, E. J. Atkinson, W. O'fallon, G. G. Klee, and B. L. Riggs, "Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* vol. 83, no. 7, pp. 2266-2274, 1998.

[84] B. M. SHERMAN, J. H. WEST, and S. G. KORENMAN, "The menopausal transition: analysis of LH, FSH, estradiol, and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* vol. 42, no. 4, pp. 629-636, 1976.

[85] J. Deslypere and A. Vermeulen, "Influence of age on steroid concentrations in skin and striated muscle in women and in cardiac muscle and lung tissue in men," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* vol. 61, no. 4, pp. 648-653, 1985.

[86] C. J. Dechenes, C. B. Verchere, S. Andrikopoulos, and S. E. Kahn, "Human aging is associated with parallel reductions in insulin and amylin release,"

American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, vol. 275, no. 5, pp. E785-E791, 1998.

[87] G. M. Fahy *et al.*, "Reversal of epigenetic aging and immunosenescent trends in humans," *Aging cell,* vol. 18, no. 6, p. e13028, 2019.

[88] C. M. Koch and W. Wagner, "Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues," *Aging (Albany NY),* vol. 3, no. 10, p. 1018, 2011.

[89] S. Kabacik *et al.*, "The relationship between epigenetic age and the hallmarks of aging in human cells," *Nature Aging,* vol. 2, no. 6, pp. 484-493, 2022.

[90] A. Kandlur, K. Satyamoorthy, and G. Gangadharan, "Oxidative stress in cognitive and epigenetic aging: a retrospective glance," *Frontiers in Molecular Neuroscience,* vol. 13, p. 41, 2020.

[91] D. Harman, "The free radical theory of aging," *Antioxidants and Redox Signaling,* vol. 5, no. 5, pp. 557-561, 2003.

[92] G. Martemucci, C. Costagliola, M. Mariano, L. D'andrea, P. Napolitano, and A. G. D'Alessandro, "Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health," *Oxygen,* vol. 2, no. 2, pp. 48-78, 2022.

[93] M. Fournet, F. Bonté, and A. Desmoulière, "Glycation damage: a possible hub for major pathophysiological disorders and aging," *Aging and disease,* vol. 9, no. 5, p. 880, 2018.

[94] V. M. Monnier, R. R. Kohn, and A. Cerami, "Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 81, no. 2, pp. 583-587, 1984.

[95] H. Saibil, "Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation," *Nature reviews Molecular cell biology,* vol. 14, no. 10, pp. 630-642, 2013.

[96] P. Consortium *et al.*, "A comprehensive enumeration of the human proteostasis network. 1. Components of translation, protein folding, and organelle-specific systems," *BioRxiv,* p. 2022.08. 30.505920, 2022.

[97] S. Elsasser *et al.*, "A comprehensive enumeration of the human proteostasis network. 2. Components of the autophagy-lysosome pathway," *bioRxiv,* 2023.

[98] J. Labbadia and R. I. Morimoto, "The biology of proteostasis in aging and disease," *Annual review of biochemistry,* vol. 84, no. 1, pp. 435-464, 2015.

[99] R. C. Taylor and A. Dillin, "Aging as an event of proteostasis collapse," *Cold Spring Harbor perspectives in biology,* vol. 3, no. 5, p. a004440, 2011.

[100] M. S. Hipp, P. Kasturi, and F. U. Hartl, "The proteostasis network and its decline in ageing," *Nature reviews Molecular cell biology,* vol. 20, no. 7, pp. 421-435, 2019.

[101] D. G. Johnson and C. L. Walker, "Cyclins and cell cycle checkpoints," *Annual review of pharmacology and toxicology,* vol. 39, no. 1, pp. 295-312, 1999.

[102] G. P. V. Reddy, "Cell cycle: regulatory events in G1→ S transition of mammalian cells," *Journal of cellular biochemistry,* vol. 54, no. 4, pp. 379-386, 1994.

[103] A. N. Kousholt, T. Menzel, and C. S. Sørensen, "Pathways for genome integrity in G2 phase of the cell cycle," *Biomolecules,* vol. 2, no. 4, pp. 579-607, 2012.

[104] K. Vermeulen, D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman, "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer," *Cell proliferation,* vol. 36, no. 3, pp. 131-149, 2003.

[105] E. Israels and L. Israels, "The cell cycle," *The oncologist,* vol. 5, no. 6, pp. 510-513, 2000.

[106] S. R. Whittaker, A. Mallinger, P. Workman, and P. A. Clarke, "Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics," *Pharmacology & therapeutics,* vol. 173, pp. 83-105, 2017.

[107] J. O. Funk, "Cell Cycle Checkpoint Genes and Cancer," in *Encyclopedia of Life Sciences*.

[108] Y. Liu *et al.*, "Transcriptional cyclin-dependent kinases: Potential drug targets in cancer therapy," *European Journal of Medicinal Chemistry,* vol. 229, p. 114056, 2022/02/05/ 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.114056.

[109] L. Ding *et al.*, "The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer," *International journal of molecular sciences,* vol. 21, no. 6, p. 1960, 2020.

[110] C. J. Sherr, "D-type cyclins," *Trends in biochemical sciences,* vol. 20, no. 5, pp. 187-190, 1995.

[111] J. A. Diehl, "Cycling to cancer with cyclin D1," *Cancer biology & therapy,* vol. 1, no. 3, pp. 226-231, 2002.

[112] J. Lukas, J. Bartkova, M. Rohde, M. Strauss, and J. Bartek, "Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity," *Molecular and cellular biology,* 1995.

[113] M. E. Ewen, H. K. Sluss, C. J. Sherr, H. Matsushime, J.-y. Kato, and D. M. Livingston, "Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins," *Cell,* vol. 73, no. 3, pp. 487-497, 1993.

[114] J.-Y. Kato, H. Matsushime, S. W. Hiebert, M. E. Ewen, and C. J. Sherr, "Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4," *Genes & development,* vol. 7, no. 3, pp. 331-342, 1993.

[115] D. G. Johnson and R. Schneider-Broussard, "Role of E2F in cell cycle control and cancer," *Front Biosci,* vol. 3, no. 4, pp. d447-8, 1998.

[116] M. Hengstschläger, K. Braun, T. Soucek, A. Miloloza, and E. Hengstschläger-Ottnad, "Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle," *Mutation Research/Reviews in Mutation Research,* vol. 436, no. 1, pp. 1-9, 1999.

[117] Y. Geng *et al.*, "Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein," *Oncogene,* vol. 12, no. 6, pp. 1173-1180, 1996.

[118] K. Ohtani, J. Degregori, and J. R. Nevins, "Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 92, no. 26, pp. 12146-12150, 1995.

[119] M. Ohtsubo, A. M. Theodoras, J. Schumacher, J. M. Roberts, and M. Pagano, "Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition," *Molecular and cellular biology,* vol. 15, no. 5, pp. 2612-2624, 1995.

[120] P. W. Hinds, S. Mittnacht, V. Dulic, A. Arnold, S. I. Reed, and R. A. Weinberg, "Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins," *Cell,* vol. 70, no. 6, pp. 993-1006, 1992.

[121] M. Malumbres, "Cyclin-dependent kinases," *Genome biology,* vol. 15, pp. 1-10, 2014.

[122] R. P. Fisher and D. O. Morgan, "A novel cyclin associates with M015/CDK7 to form the CDK-activating kinase," *Cell,* vol. 78, no. 4, pp. 713-724, 1994.

[123] K. Glover-Cutter *et al.*, "TFIIH-associated Cdk7 kinase functions in phosphorylation of C-terminal domain Ser7 residues, promoter-proximal pausing, and termination by RNA polymerase II," *Molecular and cellular biology,* vol. 29, no. 20, pp. 5455-5464, 2009.

[124] S. Larochelle *et al.*, "Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells," *Molecular cell,* vol. 25, no. 6, pp. 839-850, 2007.

[125] H. B. Gerber, Y. Pikman, and R. P. Fisher, "The CDK-activating kinase (CAK) Csk1 is required for normal levels of homologous recombination and resistance to DNA damage in fission yeast," *PLoS One,* vol. 3, no. 1, p. e1492, 2008.

[126] X. Bisteau *et al.*, "CDK4 T172 phosphorylation is central in a CDK7-dependent bidirectional CDK4/CDK2 interplay mediated by p21 phosphorylation at the restriction point," *PLoS genetics,* vol. 9, no. 5, p. e1003546, 2013.

[127] S. Larochelle *et al.*, "Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II," *Nature structural & molecular biology,* vol. 19, no. 11, pp. 1108-1115, 2012.

[128] M. Peyressatre, C. Prével, M. Pellerano, and M. C. Morris, "Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to peptide inhibitors," *Cancers,* vol. 7, no. 1, pp. 179-237, 2015.

[129] J. C. Mombach, C. A. Bugs, and C. Chaouiya, "Modelling the onset of senescence at the G1/S cell cycle checkpoint," *BMC genomics,* vol. 15, pp. 1-11, 2014.

[130] J. Pietenpol and Z. Stewart, "Cell cycle checkpoint signaling:: Cell cycle arrest versus apoptosis," *toxicology,* vol. 181, pp. 475-481, 2002.

[131] Y. Xiong, "Why are there so many CDK inhibitors?," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer,* vol. 1288, no. 1, pp. O1-O5, 1996.

[132] C. J. Sherr and J. M. Roberts, "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases," *Genes and development,* vol. 9, no. 10, pp. 1149-1163, 1995.

[133] A. Carnero and G. Hannon, "The INK4 family of CDK inhibitors," *Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors,* pp. 43-55, 1998.

[134] S. Chellappan, A. Giordano, and P. Fisher, "Role of cyclin-dependent kinases and their inhibitors in cellular differentiation and development," *Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors,* pp. 57-103, 1998.

[135] J. W. Harper, G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S. J. Elledge, "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases," *Cell,* vol. 75, no. 4, pp. 805-816, 1993.

[136] A. Krempler, D. Deckbar, P. A. Jeggo, and M. Lobrich, "An imperfect G2M checkpoint contributes to chromosome instability following irradiation of S and G2 phase cells," *Cell cycle,* vol. 6, no. 14, pp. 1682-1686, 2007.

[137] B. Furnari, N. Rhind, and P. Russell, "Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase," *Science,* vol. 277, no. 5331, pp. 1495-1497, 1997.

[138] I. A. Manke, A. Nguyen, D. Lim, M. Q. Stewart, A. E. Elia, and M. B. Yaffe, "MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation," *Molecular cell,* vol. 17, no. 1, pp. 37-48, 2005.

[139] H. C. Reinhardt, A. S. Aslanian, J. A. Lees, and M. B. Yaffe, "p53-deficient cells rely on ATM-and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage," *Cancer cell,* vol. 11, no. 2, pp. 175-189, 2007.

[140] O. Hashimoto *et al.*, "Cell cycle regulation by the Wee1 inhibitor PD0166285, pyrido [2, 3-d] pyimidine, in the B16 mouse melanoma cell line," *BMC cancer,* vol. 6, pp. 1-11, 2006.

[141] B. Ren *et al.*, "E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints," (in eng), *Genes Dev,* vol. 16, no. 2, pp. 245-56, Jan 15 2002, doi: 10.1101/gad.949802.

[142] I. Thurlings and A. de Bruin, "E2F Transcription Factors Control the Roller Coaster Ride of Cell Cycle Gene Expression," (in eng), *Methods Mol Biol,* vol. 1342, pp. 71-88, 2016, doi: 10.1007/978-1-4939-2957-3_4.

[143] S. Polager and D. Ginsberg, "p53 and E2f: partners in life and death," (in eng), *Nat Rev Cancer,* vol. 9, no. 10, pp. 738-48, Oct 2009, doi: 10.1038/nrc2718.

[144] J. DeGregori and D. G. Johnson, "Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis," (in eng), *Curr Mol Med,* vol. 6, no. 7, pp. 739-48, Nov 2006, doi: 10.2174/156652401060607073 9.

[145] D. Xie, Q. Pei, J. Li, X. Wan, and T. Ye, "Emerging Role of E2F Family in Cancer Stem Cells," (in eng), *Front Oncol,* vol. 11, p. 723137, 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.723137.

[146] C. Genovese, D. Trani, M. Caputi, and P. Claudio, "Cell cycle control and beyond: emerging roles for the retinoblastoma gene family," *Oncogene,* vol. 25, no. 38, pp. 5201-5209, 2006.

[147] S. A. Henley and F. A. Dick, "The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle," (in eng), *Cell Div,* vol. 7, no. 1, p. 10, Mar 14 2012, doi: 10.1186/1747-1028-7-10.

[148] J. Kato, H. Matsushime, S. W. Hiebert, M. E. Ewen, and C. J. Sherr, "Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4," (in eng), *Genes Dev,* vol. 7, no. 3, pp. 331-42, Mar 1993, doi: 10.1101/gad.7.3.331.

[149] S. Manickavinayaham, B. K. Dennehey, and D. G. Johnson, "Direct Regulation of DNA Repair by E2F and RB in Mammals and Plants: Core Function or Convergent Evolution?," *Cancers (Basel),* vol. 13, no. 5, Feb 24 2021, doi: 10.3390/cancers13050934.

[150] J. A. Endicott and M. E. Noble, "Structural principles in cell-cycle control: beyond the CDKs," (in eng), *Structure,* vol. 6, no. 5, pp. 535-41, May 15 1998, doi: 10.1016/s0969-2126(98)00055-0.

[151] D. G. Johnson and R. Schneider-Broussard, "Role of E2F in cell cycle control and cancer," (in eng), *Front Biosci,* vol. 3, pp. d447-8, Apr 27 1998, doi: 10.2741/a291.

[152] H. K. Matthews, C. Bertoli, and R. A. M. De Bruin, "Cell cycle control in cancer," *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* vol. 23, no. 1, pp. 74-88, 2022, doi: 10.1038/s41580-021-00404-3.

[153] H. Z. Chen, S. Y. Tsai, and G. Leone, "Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control," (in eng), *Nat Rev Cancer,* vol. 9, no. 11, pp. 785-97, Nov 2009, doi: 10.1038/nrc2696.

[154] M. S. Schrock, B. R. Stromberg, L. Scarberry, and M. K. Summers, "APC/C ubiquitin ligase: Functions and mechanisms in tumorigenesis," (in eng), *Semin Cancer Biol,* vol. 67, no. Pt 2, pp. 80-91, Dec 2020, doi: 10.1016/j.semcancer.2020.03.001.

[155] D. Barford, "Structural insights into anaphase-promoting complex function and mechanism," (in eng), *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,* vol. 366, no. 1584, pp. 3605-24, Dec 27 2011, doi: 10.1098/rstb.2011.0069.

[156] J. Kernan, T. Bonacci, and M. J. Emanuele, "Who guards the guardian? Mechanisms that restrain APC/C during the cell cycle," (in eng), *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res,* vol. 1865, no. 12, pp. 1924-1933, Dec 2018, doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.09.011.

[157] J. Xie, Y. Jin, and G. Wang, "The role of SCF ubiquitin-ligase complex at the beginning of life," *Reproductive Biology and Endocrinology,* vol. 17, no. 1, p. 101, 2019/11/28 2019, doi: 10.1186/s12958-019-0547-y.

[158] L. L. Thompson, K. A. Rutherford, C. C. Lepage, and K. J. McManus, "The SCF Complex Is Essential to Maintain Genome and Chromosome Stability," vol. 22, no. 16, Aug 9 2021, doi: 10.3390/ijms22168544.

[159] F. Dang, L. Nie, and W. Wei, "Ubiquitin signaling in cell cycle control and tumorigenesis," *Cell Death & Differentiation,* vol. 28, no. 2, pp. 427-438, 2021/02/01 2021, doi: 10.1038/s41418-020-00648-0.

[160] X. L. Ang and J. Wade Harper, "SCF-mediated protein degradation and cell cycle control," *Oncogene,* vol. 24, no. 17, pp. 2860-2870, 2005/04/01 2005, doi: 10.1038/sj.onc.1208614.

[161] T. Tchkonia, Y. Zhu, J. Van Deursen, J. Campisi, and J. L. Kirkland, "Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities," *The Journal of clinical investigation,* vol. 123, no. 3, pp. 966-972, 2013.

[162] K. C. Mbara, N. Devnarain, and P. M. Owira, "Potential Role of Polyphenolic Flavonoids as Senotherapeutic Agents in Degenerative Diseases and Geroprotection," *Pharmaceutical Medicine,* vol. 36, no. 6, pp. 331-352, 2022.

[163] F. A. Valentijn, L. L. Falke, T. Q. Nguyen, and R. Goldschmeding, "Cellular senescence in the aging and diseased kidney," *Journal of cell communication and signaling,* vol. 12, pp. 69-82, 2018.

[164] L. G. L. Prata, I. G. Ovsyannikova, T. Tchkonia, and J. L. Kirkland, "Senescent cell clearance by the immune system: Emerging therapeutic opportunities," in *Seminars in immunology*, 2018, vol. 40: Elsevier, p. 101275.

[165] G. P. Dimri *et al.*, "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 92, no. 20, pp. 9363-9367, 1995.

[166] J. C. Jeyapalan and J. M. Sedivy, "Cellular senescence and organismal aging," *Mechanisms of ageing and development,* vol. 129, no. 7-8, pp. 467-474, 2008.

[167] M. C. Velarde, M. Demaria, and J. Campisi, "Senescent cells and their secretory phenotype as targets for cancer therapy," *Cancer and Aging,* vol. 38, pp. 17-27, 2013.

[168] K. Nishio and A. Inoue, "Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts," *Histochemistry and cell biology,* vol. 123, pp. 263-273, 2005.

[169] Q. M. Chen, V. C. Tu, J. Catania, M. Burton, O. Toussaint, and T. Dilley, "Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide," *Journal of cell science,* vol. 113, no. 22, pp. 4087-4097, 2000.

[170] K. A. Cho *et al.*, "Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status," *Journal of Biological Chemistry,* vol. 279, no. 40, pp. 42270-42278, 2004.

[171] K. Nishio, A. Inoue, S. Qiao, H. Kondo, and A. Mimura, "Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts," *Histochemistry and cell biology,* vol. 116, pp. 321-327, 2001.

[172] A. Biran *et al.*, "Quantitative identification of senescent cells in aging and disease," *Aging cell,* vol. 16, no. 4, pp. 661-671, 2017.

[173] U. Herbig, M. Ferreira, L. Condel, D. Carey, and J. M. Sedivy, "Cellular senescence in aging primates," *Science,* vol. 311, no. 5765, pp. 1257-1257, 2006.

[174] D. A. Lewis, J. B. Travers, C. Machado, A.-K. Somani, and D. F. Spandau, "Reversing the aging stromal phenotype prevents carcinoma initiation," *Aging (Albany NY),* vol. 3, no. 4, p. 407, 2011.

[175] B. Y. Lee *et al.*, "Senescence-associated β-galactosidase is lysosomal β-galactosidase," *Aging cell,* vol. 5, no. 2, pp. 187-195, 2006.

[176] T. Tominaga, R. Shimada, Y. Okada, T. Kawamata, and K. Kibayashi, "Senescence-associated-β-galactosidase staining following traumatic brain injury in the mouse cerebrum," *PLoS One,* vol. 14, no. 3, p. e0213673, 2019.

[177] T. Kuilman, C. Michaloglou, W. J. Mooi, and D. S. Peeper, "The essence of senescence," *Genes & development,* vol. 24, no. 22, pp. 2463-2479, 2010.

[178] A. Chandra *et al.*, "Targeted reduction of senescent cell burden alleviates focal radiotherapy-related bone loss," *Journal of Bone and Mineral Research,* vol. 35, no. 6, pp. 1119-1131, 2020.

[179] E. Ciaglia *et al.*, "Transfer of the longevity-associated variant of BPIFB4 gene rejuvenates immune system and vasculature by a reduction of CD38+ macrophages and NAD+ decline," *Cell Death & Disease,* vol. 13, no. 1, p. 86, 2022.

[180] S. Disayabutr *et al.*, "miR-34 miRNAs regulate cellular senescence in type II alveolar epithelial cells of patients with idiopathic pulmonary fibrosis," *PloS one,* vol. 11, no. 6, p. e0158367, 2016.

[181] T. Kouzarides, "Chromatin modifications and their function," *Cell,* vol. 128, no. 4, pp. 693-705, 2007.

[182] M. Narita *et al.*, "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence," *Cell,* vol. 113, no. 6, pp. 703-716, 2003.

[183] R. Zhang, W. Chen, and P. D. Adams, "Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci," *Molecular and cellular biology,* 2007.

[184] X. Ye *et al.*, "Definition of pRB-and p53-dependent and-independent steps in HIRA/ASF1a-mediated formation of senescence-associated heterochromatin foci," *Molecular and cellular biology,* 2007.

[185] M. Narita *et al.*, "A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation," *Cell,* vol. 126, no. 3, pp. 503-514, 2006.

[186] R. Zhang *et al.*, "Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA," *Developmental cell,* vol. 8, no. 1, pp. 19-30, 2005.

[187] J.-P. Coppé *et al.*, "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor," *PLoS biology,* vol. 6, no. 12, p. e301, 2008.

[188] J.-P. Coppé, P.-Y. Desprez, A. Krtolica, and J. Campisi, "The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression," *Annual review of pathology: mechanisms of disease,* vol. 5, no. 1, pp. 99-118, 2010.

[189] V. Gorgoulis *et al.*, "Cellular senescence: defining a path forward," *Cell,* vol. 179, no. 4, pp. 813-827, 2019.

[190] N. Ohtani, K. Yamakoshi, A. Takahashi, and E. Hara, "The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression," *The Journal of Medical Investigation,* vol. 51, no. 3, 4, pp. 146-153, 2004.

[191] C. J. Sherr and J. M. Roberts, "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression," *Genes & development,* vol. 13, no. 12, pp. 1501-1512, 1999.

[192] J. Krishnamurthy *et al.*, "Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging," *The Journal of clinical investigation,* vol. 114, no. 9, pp. 1299-1307, 2004.

[193] S. Ressler *et al.*, "p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin," *Aging cell,* vol. 5, no. 5, pp. 379-389, 2006.

[194] J. C. Acosta *et al.*, "A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence," *Nature cell biology,* vol. 15, no. 8, pp. 978-990, 2013.

[195] L. Cuollo, F. Antonangeli, A. Santoni, and A. Soriani, "The senescence-associated secretory phenotype (SASP) in the challenging future of cancer therapy and age-related diseases," *Biology,* vol. 9, no. 12, p. 485, 2020.

[196] G.-J. Tai *et al.*, "NLRP3 inflammasome links vascular senescence to diabetic vascular lesions," *Pharmacological Research,* vol. 178, p. 106143, 2022.

[197] R. Zhu, H. Wan, H. Yang, M. Song, Y. Chai, and B. Yu, "The role of senescence-associated secretory phenotype in bone loss," *Frontiers in Cell and Developmental Biology,* vol. 10, p. 841612, 2022.

[198] G. Giglia-Mari, A. Zotter, and W. Vermeulen, "DNA damage response," *Cold Spring Harbor perspectives in biology,* vol. 3, no. 1, p. a000745, 2011.

[199] O. Cazzalini, A. I. Scovassi, M. Savio, L. A. Stivala, and E. Prosperi, "Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response," *Mutation Research/Reviews in Mutation Research,* vol. 704, no. 1-3, pp. 12-20, 2010.

[200] L. S. Reinhardt, K. Groen, C. Newton, and K. A. Avery-Kiejda, "The role of truncated p53 isoforms in the DNA damage response," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer,* p. 188882, 2023.

[201] S. Kumari, R. Dhapola, and D. H. Reddy, "Apoptosis in Alzheimer's disease: insight into the signaling pathways and therapeutic avenues," *Apoptosis,* vol. 28, no. 7, pp. 943-957, 2023.

[202] B. Pucci, M. Kasten, and A. Giordano, "Cell cycle and apoptosis," *Neoplasia,* vol. 2, no. 4, pp. 291-299, 2000.

[203] W. Hu and J. J. Kavanagh, "Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway," *The lancet oncology,* vol. 4, no. 12, pp. 721-729, 2003.

[204] K.-M. Debatin and P. H. Krammer, "Death receptors in chemotherapy and cancer," *Oncogene,* vol. 23, no. 16, pp. 2950-2966, 2004.

[205] A. Tkachenko, "Apoptosis and eryptosis: similarities and differences," *Apoptosis,* vol. 29, no. 3, pp. 482-502, 2024.

[206] S. Fulda and K.-M. Debatin, "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy," *Oncogene,* vol. 25, no. 34, pp. 4798-4811, 2006.

[207] Z.-Q. Wang *et al.*, "Mice lacking ADPRT and poly (ADP-ribosyl) ation develop normally but are susceptible to skin disease," *Genes & development,* vol. 9, no. 5, pp. 509-520, 1995.

[208] R. Yosef *et al.*, "Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL," *Nature communications,* vol. 7, no. 1, p. 11190, 2016.

[209] R. Marcotte, C. Lacelle, and E. Wang, "Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3," *Mechanisms of ageing and development,* vol. 125, no. 10-11, pp. 777-783, 2004.

[210] A. Mirza *et al.*, "Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression," *Oncogene,* vol. 22, no. 23, pp. 3645-3654, 2003.

[211] S. Maddika *et al.*, "Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy," *Drug Resistance Updates,* vol. 10, no. 1-2, pp. 13-29, 2007.

[212] N. Martin, N. Popgeorgiev, G. Ichim, and D. Bernard, "BCL-2 proteins in senescence: beyond a simple target for senolysis?," *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* vol. 24, no. 8, pp. 517-518, 2023.

[213] K. Vermeulen, Z. N. Berneman, and D. R. Van Bockstaele, "Cell cycle and apoptosis," *Cell proliferation,* vol. 36, no. 3, pp. 165-175, 2003.

[214] J.-F. Tang, Q. Wen, J. Sun, W.-M. Zhang, and H.-L. Zhu, "Advances in the researches on the biological activities and inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase," *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents),* vol. 14, no. 5, pp. 673-687, 2014.

[215] M. P. Baar *et al.*, "Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging," *Cell,* vol. 169, no. 1, pp. 132-147. e16, 2017.

[216] Y. Tian, Y. Zhang, and X. Fu, "β cell senescence as a common contributor to type 1 and type 2 diabetes," *Trends in Molecular Medicine,* vol. 25, no. 9, pp. 735-737, 2019.

[217] C. M. Roos *et al.*, "Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice," *Aging cell,* vol. 15, no. 5, pp. 973-977, 2016.

[218] A. Calcinotto, J. Kohli, E. Zagato, L. Pellegrini, M. Demaria, and A. Alimonti, "Cellular senescence: aging, cancer, and injury," *Physiological reviews,* vol. 99, no. 2, pp. 1047-1078, 2019.

[219] M. Demaria *et al.*, "Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapsecellular senescence and chemotherapy," *Cancer discovery,* vol. 7, no. 2, pp. 165-176, 2017.

[220] A. D. Aravinthan and G. J. Alexander, "Senescence in chronic liver disease: Is the future in aging?," *Journal of hepatology,* vol. 65, no. 4, pp. 825-834, 2016.

[221] M. Ogrodnik *et al.*, "Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis," *Nature communications,* vol. 8, no. 1, p. 15691, 2017.

[222] O. H. Jeon *et al.*, "Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment," *Nature medicine,* vol. 23, no. 6, pp. 775-781, 2017.

[223] M. Demaria *et al.*, "An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA," *Developmental cell,* vol. 31, no. 6, pp. 722-733, 2014.

[224] W. Peilin *et al.*, "Directed elimination of senescent cells attenuates development of osteoarthritis by inhibition of c-IAP and XIAP," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease,* vol. 1865, no. 10, pp. 2618-2632, 2019.

[225] T. E. King, A. Pardo, and M. Selman, "Idiopathic pulmonary fibrosis," *The Lancet,* vol. 378, no. 9807, pp. 1949-1961, 2011.

[226] F. C. Tan, E. R. Hutchison, E. Eitan, and M. P. Mattson, "Are there roles for brain cell senescence in aging and neurodegenerative disorders?," *Biogerontology,* vol. 15, pp. 643-660, 2014.

[227] Y. Wang *et al.*, "Senomorphic agent pterostilbene ameliorates osteoarthritis through the PI3K/AKT/NF-κB axis: An in vitro and in vivo study," *American Journal of Translational Research,* vol. 14, no. 8, p. 5243, 2022.

[228] B. G. Childs, D. J. Baker, J. L. Kirkland, J. Campisi, and J. M. Van Deursen, "Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?," *EMBO reports,* vol. 15, no. 11, pp. 1139-1153, 2014.

[229] H. Power, P. Valtchev, F. Dehghani, and A. Schindeler, "Strategies for senolytic drug discovery," *Aging Cell,* vol. 22, no. 10, p. e13948, 2023.

[230] Y. Zhu *et al.*, "The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs," *Aging cell,* vol. 14, no. 4, pp. 644-658, 2015.

[231] K. S. Singh, "Pyrone-derived marine natural products: A review on isolation, bio-activities and synthesis," *Current Organic Chemistry,* vol. 24, no. 4, pp. 354-401, 2020.

[232] M. M. Heravi, M. Ghanbarian, V. Zadsirjan, and B. Alimadadi Jani, "Recent advances in the applications of Wittig reaction in the total synthesis of natural products containing lactone, pyrone, and lactam as a scaffold," *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly,* vol. 150, pp. 1365-1407, 2019.

[233] W. Wilk, H. Waldmann, and M. Kaiser, "γ-Pyrone natural products—A privileged compound class provided by nature," *Bioorganic & medicinal chemistry,* vol. 17, no. 6, pp. 2304-2309, 2009.

[234] M. T. Bakić, M. Cetina, and S. Mazalović, "Molecular structure of a tolyl derivative of γ-pyrone," *Journal of molecular structure,* vol. 1151, pp. 256-265, 2018.

[235] D. K. Singh, K. Gulati, and A. Ray, "Effects of chelidonic acid, a secondary plant metabolite, on mast cell degranulation and adaptive immunity in rats," *International Immunopharmacology,* vol. 40, pp. 229-234, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.08.009.

[236] S.-J. Kim, D.-S. Kim, S.-H. Lee, E.-M. Ahn, J.-Y. Kee, and S.-H. Hong, "Chelidonic acid ameliorates atopic dermatitis symptoms through suppression the inflammatory mediators in in vivo and in vitro," *Applied Biological Chemistry,* vol. 66, no. 1, p. 12, 2023.

[237] D.-S. Kim, S.-J. Kim, M.-C. Kim, Y.-D. Jeon, J.-y. Um, and S.-H. Hong, "The therapeutic effect of chelidonic acid on ulcerative colitis," *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* vol. 35, no. 5, pp. 666-671, 2012, doi: https://doi.org/10.1248/bpb.35.666.

[238] T. G. Porter and D. L. Martin, "Chelidonic acid and other conformationally restricted substrate analogues as inhibitors of rat brain glutamate decarboxylase," *Biochemical pharmacology,* vol. 34, no. 23, pp. 4145-4150, 1985.

[239] H.-J. Shin, H.-L. Kim, S.-J. Kim, W.-S. Chung, S.-S. Kim, and J.-Y. Um, "Inhibitory effects of chelidonic acid on IL-6 production by blocking NF-κB and caspase-1 in HMC-1 cells," *Immunopharmacology and immunotoxicology,* vol. 33, no. 4, pp. 614-619, 2011.

[240] W. A. Bough and J. Gander, "Isolation and characterization of chelidonic acid from Sorghum vulgare," *Phytochemistry,* vol. 11, no. 1, pp. 209-213, 1972.

[241] B. V. MALLAIAH, K. A. KUMAR, P. Sarma, and G. Srimannarayana, "ISOLATION AND ANTIALLERGIC ACTIVITY OF-γ-PYRONES FROM THE FLOWERS OF CASSIA SPECTABLIS," *Current Science,* vol. 53, no. 1, pp. 33-34, 1984.

[242] C. E. Carraher Jr, M. Ayoub, M. R. Roner, A. Moric, and N. T. Trang, "Synthesis, structural characterization, and ability to inhibit the growth of pancreatic cancer by organotin polymers containing chelidonic acid," *Journal of the Chinese Advanced Materials Society,* vol. 1, no. 1, pp. 65-73, 2013, doi: https://doi.org/10.1080/22243682.2013.774522.

[243] T. S. Kamatchi, P. Kalaivani, P. Poornima, V. V. Padma, F. R. Fronczek, and K. Natarajan, "New organometallic ruthenium (II) complexes containing chelidonic acid (4-oxo-4 H-pyran-2, 6-dicarboxylic acid): synthesis, structure and in vitro biological activity," *RSC advances,* vol. 4, no. 4, pp. 2004-2022, 2014.

[244] C.-P. Segeritz and L. Vallier, "Cell culture: Growing cells as model systems in vitro," in *Basic science methods for clinical researchers*: Elsevier, 2017, pp. 151-172.

[245] M. d. C. Ponce de León-Rodríguez, J.-P. Guyot, and C. Laurent-Babot, "Intestinal in vitro cell culture models and their potential to study the effect of food components on intestinal inflammation," *Critical reviews in food science and nutrition,* vol. 59, no. 22, pp. 3648-3666, 2019.

[246] D. Galvis, D. Walsh, L. W. Harries, E. Latorre, and J. Rankin, "A dynamical systems model for the measurement of cellular senescence," *Journal of the Royal Society Interface,* vol. 16, no. 159, p. 20190311, 2019.

[247] P. Lee, R. Lin, J. Moon, and L. P. Lee, "Microfluidic alignment of collagen fibers for in vitro cell culture," *Biomedical microdevices,* vol. 8, pp. 35-41, 2006.

[248] D. Antoni, H. Burckel, E. Josset, and G. Noel, "Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo," *International journal of molecular sciences,* vol. 16, no. 3, pp. 5517-5527, 2015.

[249] K. V. Kitaeva, C. S. Rutland, A. A. Rizvanov, and V. V. Solovyeva, "Cell culture based in vitro test systems for anticancer drug screening," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology,* vol. 8, p. 322, 2020.

[250] W. Li, Y. He, R. Zhang, G. Zheng, and D. Zhou, "The curcumin analog EF24 is a novel senolytic agent," *Aging (Albany NY),* vol. 11, no. 2, p. 771, 2019.

[251] Q. M. CHEN, J. LIU, and J. B. MERRETT, "Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H2O2 response of normal human fibroblasts," *Biochemical Journal,* vol. 347, no. 2, pp. 543-551, 2000.

[252] E. L. Schneider and Y. Mitsui, "The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age," *Proceedings of the National Academy of Sciences,* vol. 73, no. 10, pp. 3584-3588, 1976.

[253] D. Y. Yoo *et al.*, "Melatonin improves D-galactose-induced aging effects on behavior, neurogenesis, and lipid peroxidation in the mouse dentate gyrus via increasing pCREB expression," *Journal of pineal research,* vol. 52, no. 1, pp. 21-28, 2012.

[254] A. Remigante *et al.*, "d-Galactose induced early aging in human erythrocytes: role of band 3 protein," *Journal of cellular physiology,* vol. 237, no. 2, pp. 1586-1596, 2022.

[255] F. Salehpour, N. Ahmadian, S. H. Rasta, M. Farhoudi, P. Karimi, and S. Sadigh-Eteghad, "Transcranial low-level laser therapy improves brain mitochondrial function and cognitive impairment in D-galactose–induced aging mice," *Neurobiology of aging,* vol. 58, pp. 140-150, 2017.

[256] K. Sun, P. Yang, R. Zhao, Y. Bai, and Z. Guo, "Matrine attenuates D-galactose-induced aging-related behavior in mice via inhibition of cellular senescence and oxidative stress," *Oxidative medicine and cellular longevity,* vol. 2018, no. 1, p. 7108604, 2018.

[257] Y. Liu, Y. Liu, Y. Guo, L. Xu, and H. Wang, "Phlorizin exerts potent effects against aging induced by D-galactose in mice and PC12 cells," *Food & Function,* vol. 12, no. 5, pp. 2148-2160, 2021.

[258] A. G. Bodnar *et al.*, "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells," *science,* vol. 279, no. 5349, pp. 349-352, 1998.

[259] N. Sitte, K. Merker, T. von Zglinicki, T. Grune, and K. J. Davies, "Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I—effects of proliferative senescence," *The FASEB Journal,* vol. 14, no. 15, pp. 2495-2502, 2000.

[260] D. Pujimulyani *et al.*, "Cosmeceutical potentials of Curcuma mangga Val. extract in human BJ fibroblasts against MMP1, MMP3, and MMP13," *Heliyon,* vol. 6, no. 9, 2020.

[261] M. Gerasymchuk, G. I. Robinson, O. Kovalchuk, and I. Kovalchuk, "Modeling of the senescence-associated phenotype in human skin fibroblasts," *International Journal of Molecular Sciences,* vol. 23, no. 13, p. 7124, 2022, doi: https://doi.org/10.3390/ijms23137124.

[262] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of immunological methods,* vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63, 1983, doi: https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.

[263] J. Kapuscinski, "DAPI: a DNA-specific fluorescent probe," *Biotechnic & histochemistry,* vol. 70, no. 5, pp. 220-233, 1995, doi: https://doi.org/10.3109/10520299509108199.

[264] M. P. Thomé *et al.*, "Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy," *Journal of cell science,* vol. 129, no. 24, pp. 4622-4632, 2016, doi: https://doi.org/10.1242/jcs.195057.

[265] B. M. Gyori, G. Venkatachalam, P. Thiagarajan, D. Hsu, and M.-V. Clement, "OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis," *Redox biology,* vol. 2, pp. 457-465, 2014.

[266] L. J. Marnett, "Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,* vol. 424, no. 1-2, pp. 83-95, 1999.

[267] H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction," *Analytical biochemistry,* vol. 95, no. 2, pp. 351-358, 1979.

[268] M. L. Wong and J. F. Medrano, "Real-time PCR for mRNA quantitation," *Biotechniques,* vol. 39, no. 1, pp. 75-85, 2005.

[269] B. Thornton and C. Basu, "Rapid and simple method of qPCR primer design," *PCR primer design,* pp. 173-179, 2015.

[270] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method," *methods,* vol. 25, no. 4, pp. 402-408, 2001.

[271] T. S. Hnasko and R. M. Hnasko, "The western blot," *ELISA: Methods and Protocols,* pp. 87-96, 2015, doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_9.

[272] A. Bainor, L. Chang, T. J. McQuade, B. Webb, and J. E. Gestwicki, "Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume," *Analytical biochemistry,* vol. 410, no. 2, pp. 310-312, 2011.

[273] C. T. Lim, F. Lolli, J. D. Thomas, B. Kola, and M. Korbonits, "Measurement of AMP-activated protein kinase activity and expression in response to ghrelin," in *Methods in enzymology*, vol. 514: Elsevier, 2012, pp. 271-287.

[274] J. Campisi and M. Fleshner, "Role of extracellular HSP72 in acute stress-induced potentiation of innate immunity in active rats," *Journal of Applied Physiology,* vol. 94, no. 1, pp. 43-52, 2003.

[275] J. Bird, E. L. Ostler, and R. G. Faragher, "Can we say that senescent cells cause ageing?," *Experimental gerontology,* vol. 38, no. 11-12, pp. 1319-1326, 2003.

[276] B. Grayson, M. Leger, C. Piercy, L. Adamson, M. Harte, and J. C. Neill, "Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents," *Behavioural brain research,* vol. 285, pp. 176-193, 2015.

[277] S. M. S. Tamijani, E. Beirami, H. Ghazvini, R. Rafaiee, M. Nazeri, and M. Razavinasab, "A Review on the Disruption of Novel Object Recognition Induced by Methamphetamine," *Addiction & Health,* vol. 15, no. 4, p. 289, 2023.

[278] L. M. Lueptow, "Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice," *Journal of visualized experiments: JoVE,* no. 126, 2017.

[279] H.-A. Oh, H.-M. Kim, and H.-J. Jeong, "Beneficial effects of chelidonic acid on a model of allergic rhinitis," *International immunopharmacology,* vol. 11, no. 1, pp. 39-45, 2011, doi: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.10.002.

[280] S. Fleige and M. W. Pfaffl, "RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance," *Molecular aspects of medicine,* vol. 27, no. 2-3, pp. 126-139, 2006.

[281] D. Dutta *et al.*, "COVID-19 diagnosis: a comprehensive review of the RT-qPCR method for detection of SARS-CoV-2," *Diagnostics,* vol. 12, no. 6, p. 1503, 2022.

[282] S. I. Khairnar, Y. A. Kulkarni, and K. Singh, "Mitigation of cisplatin-induced nephrotoxicity by chelidonic acid in Wistar rats," *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology,* vol. 81, p. 127321, 2024.

[283] M. Ibragimova, A. Kussainova, A. Aripova, R. Bersimbaev, and O. Bulgakova, "The Molecular Mechanisms in Senescent Cells Induced by Natural Aging and Ionizing Radiation," *Cells,* vol. 13, no. 6, p. 550, 2024.

[284] R. Marcotte and E. Wang, "Replicative senescence revisited," *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences,* vol. 57, no. 7, pp. B257-B269, 2002.

[285] L. Hayflick and P. S. Moorhead, "The serial cultivation of human diploid cell strains," *Experimental cell research,* vol. 25, no. 3, pp. 585-621, 1961.

[286] A. Macieira-Coelho, "Growth inhibition of human fibroblasts in vitro," *Inhibitors of Cell Growth,* pp. 249-270, 1998.

[287] Y. Valieva, E. Ivanova, A. Fayzullin, A. Kurkov, and A. Igrunkova, "Senescence-associated β-galactosidase detection in pathology," *Diagnostics,* vol. 12, no. 10, p. 2309, 2022.

[288] K. Itahana, J. Campisi, and G. P. Dimri, "Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated β-galactosidase assay," *Biological aging: methods and protocols,* pp. 21-31, 2007.

[289] C. A. Hoogstraten, J. A. Smeitink, F. G. Russel, and T. J. Schirris, "Dissecting drug-induced cytotoxicity and metabolic dysfunction in conditionally immortalized human proximal tubule cells," *Frontiers in Toxicology,* vol. 4, p. 842396, 2022.

[290] X. Zhu *et al.*, "The preconditioning of berberine suppresses hydrogen peroxide-induced premature senescence via regulation of sirtuin 1," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity,* vol. 2017, 2017, doi: https://doi.org/10.1155/2017/2391820.

[291] J. Miquel, "An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging," *Current pharmaceutical design,* vol. 15, no. 26, pp. 3003-3026, 2009.

[292] R. Kumar, A. Sharma, A. Kumari, A. Gulati, Y. Padwad, and R. Sharma, "Epigallocatechin gallate suppresses premature senescence of preadipocytes by inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway and induces senescent cell death by regulation of Bax/Bcl-2 pathway," *Biogerontology,* vol. 20, pp. 171-189, 2019.

[293] J. Fang *et al.*, "Metformin alleviates human cellular aging by upregulating the endoplasmic reticulum glutathione peroxidase 7," *Aging cell,* vol. 17, no. 4, p. e12765, 2018.

[294] O. Moiseeva *et al.*, "Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-κ B activation," *Aging cell,* vol. 12, no. 3, pp. 489-498, 2013.

[295] M. C. X. de Godoy, J. A. Macedo, and A. Gambero, "Researching New Drug Combinations with Senolytic Activity Using Senescent Human Lung Fibroblasts MRC-5 Cell Line," *Pharmaceuticals,* vol. 17, no. 1, p. 70, 2024.

[296] V. C. Birar, A. N. Sheerin, E. L. Ostler, and R. G. Faragher, "Novel resveratrol derivatives have diverse effects on the survival, proliferation and senescence of primary human fibroblasts," *Biogerontology,* vol. 21, pp. 817-826, 2020.

[297] L. Zhang, L. E. Pitcher, V. Prahalad, L. J. Niedernhofer, and P. D. Robbins, "Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics," *The FEBS journal,* vol. 290, no. 5, pp. 1362-1383, 2023.

[298] K. G. Porter and Y. S. Feig, "The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora 1," *Limnology and oceanography,* vol. 25, no. 5, pp. 943-948, 1980, doi: https://doi.org/10.4319/lo.1980.25.5.0943.

[299] E. C. Swanson, B. Manning, H. Zhang, and J. B. Lawrence, "Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence," *Journal of Cell Biology,* vol. 203, no. 6, pp. 929-942, 2013.

[300] M. Hayashi, T. Sofuni, and M. Ishidate Jr, "An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test," *Mutation Research Letters,* vol. 120, no. 4, pp. 241-247, 1983.

[301] T. Kurz, J. W. Eaton, and U. T. Brunk, "Redox activity within the lysosomal compartment: implications for aging and apoptosis," *Antioxidants & redox signaling,* vol. 13, no. 4, pp. 511-523, 2010.

[302] D. J. Kurz, S. Decary, Y. Hong, and J. D. Erusalimsky, "Senescence-associated β-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells," *Journal of cell science,* vol. 113, no. 20, pp. 3613-3622, 2000.

[303] M. E. Copp *et al.*, "Comet assay for quantification of the increased DNA damage burden in primary human chondrocytes with aging and osteoarthritis," *Aging Cell,* vol. 21, no. 9, p. e13698, 2022.

[304] P. Morlière and R. Santus, "Pro-oxidant role of superoxide dismutase in ultraviolet-A-induced lipid peroxidation in cultured normal human skin fibroblasts," *European journal of biochemistry,* vol. 256, no. 1, pp. 184-189, 1998.

[305] J.-N. Lin and C. H. Kao, "Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves," *Botanical Bulletin of Academia Sinica,* vol. 39, 1998.

[306] E. Panieri, V. Gogvadze, E. Norberg, R. Venkatesh, S. Orrenius, and B. Zhivotovsky, "Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence," *Free Radical Biology and Medicine,* vol. 57, pp. 176-187, 2013.

[307] Y. Zhang *et al.*, "A new role for oxidative stress in aging: the accelerated aging phenotype in Sod1−/− mice is correlated to increased cellular senescence," *Redox biology,* vol. 11, pp. 30-37, 2017.

[308] A. Pole, M. Dimri, and G. P. Dimri, "Oxidative stress, cellular senescence and ageing," *AIMS molecular science,* vol. 3, no. 3, 2016.

[309] G. Aviv and O. Gal-Mor, "Real-time reverse transcription PCR as a tool to study virulence gene regulation in bacterial pathogens," *Host-Pathogen Interactions: Methods and Protocols,* pp. 23-32, 2018.

[310] R. L. Cohn, N. S. Gasek, G. A. Kuchel, and M. Xu, "The heterogeneity of cellular senescence: insights at the single-cell level," *Trends in cell biology,* vol. 33, no. 1, pp. 9-17, 2023.

[311] A. Hernandez-Segura, T. V. de Jong, S. Melov, V. Guryev, J. Campisi, and M. Demaria, "Unmasking transcriptional heterogeneity in senescent cells," *Current Biology,* vol. 27, no. 17, pp. 2652-2660. e4, 2017, doi: https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.033.

[312] B. Kim, "Western blot techniques," *Molecular profiling: Methods and protocols,* pp. 133-139, 2017.

[313] S. He and N. E. Sharpless, "Senescence in health and disease," *Cell,* vol. 169, no. 6, pp. 1000-1011, 2017.

[314] J. Campisi and L. Robert, "Cell senescence: role in aging and age-related diseases," *Aging,* vol. 39, pp. 45-61, 2014.

[315] M. S. Choudhery, M. Badowski, A. Muise, J. Pierce, and D. T. Harris, "Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation," *Journal of translational medicine,* vol. 12, pp. 1-14, 2014.

[316] H. Wong and K. Riabowol, "Differential CDK-inhibitor gene expression in aging human diploid fibroblasts," *Experimental gerontology,* vol. 31, no. 1-2, pp. 311-325, 1996.

[317] G. H. Stein and V. Dulić, "Molecular mechanisms for the senescent cell cycle arrest," in *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 1998, vol. 3, no. 1: Elsevier, pp. 14-18.

[318] Z. Zhou, Y. Yin, Q. Chang, G. Sun, J. Lin, and Y. Dai, "Downregulation of B-myb promotes senescence via the ROS-mediated p53/p21 pathway, in vascular endothelial cells," *Cell proliferation,* vol. 50, no. 2, p. e12319, 2017.

[319] N. S. M. Kamal, S. Safuan, S. Shamsuddin, and P. Foroozandeh, "Aging of the cells: Insight into cellular senescence and detection Methods," *European journal of cell biology,* vol. 99, no. 6, p. 151108, 2020.

[320] J. V. Olsen and M. Mann, "Status of large-scale analysis of post-translational modifications by mass spectrometry," *Molecular & cellular proteomics,* vol. 12, no. 12, pp. 3444-3452, 2013, doi: https://doi.org/10.1074/mcp.O113.034181.

[321] S. J. Ziegler, S. J. Mallinson, P. C. S. John, and Y. J. Bomble, "Advances in integrative structural biology: Towards understanding protein complexes in their cellular context," *Computational and Structural Biotechnology Journal,* vol. 19, pp. 214-225, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.052.

[322] M. Zhang and W. Ying, "NAD+ deficiency is a common central pathological factor of a number of diseases and aging: mechanisms and therapeutic implications," *Antioxidants & redox signaling,* vol. 30, no. 6, pp. 890-905, 2019, doi: https://doi.org/10.1089/ars.2017.7445.

[323] C.-L. Kao *et al.*, "Resveratrol protects human endothelium from H2O2-induced oxidative stress and senescence via SirT1 activation," *Journal of atherosclerosis and thrombosis,* vol. 17, no. 9, pp. 970-979, 2010.

[324] J.-w. Hwang, H. Yao, S. Caito, I. K. Sundar, and I. Rahman, "Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence," *Free Radical Biology and Medicine,* vol. 61, pp. 95-110, 2013.

[325] H. Ota *et al.*, "Cilostazol inhibits oxidative stress–induced premature senescence via upregulation of Sirt1 in human endothelial cells,"

Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, vol. 28, no. 9, pp. 1634-1639, 2008.

[326] Y. Yang *et al.*, "Regulation of SIRT1 and its roles in inflammation," *Frontiers in immunology,* vol. 13, p. 831168, 2022.

[327] D. Tran *et al.*, "Insulin-like growth factor-1 regulates the SIRT 1-p53 pathway in cellular senescence," *Aging cell,* vol. 13, no. 4, pp. 669-678, 2014.

[328] Z. Xue and B. Demple, "Knockout and inhibition of Ape1: roles of Ape1 in base excision DNA repair and modulation of gene expression," *Antioxidants,* vol. 11, no. 9, p. 1817, 2022, doi: https://doi.org/10.3390/antiox11091817.

[329] D. Rios-Covian *et al.*, "A Novel Hypomorphic Apex1 Mouse Model Implicates Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 in Oxidative DNA Damage Repair in Gastric Epithelial Cells," *Antioxidants & Redox Signaling,* vol. 38, no. 1-3, pp. 183-197, 2023, doi: https://doi.org/10.1089/ars.2021.0119.

[330] Y. Huang, W. Li, Z.-y. Su, and A.-N. T. Kong, "The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response," *The Journal of nutritional biochemistry,* vol. 26, no. 12, pp. 1401-1413, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.08.001.

[331] B. M. Hybertson, B. Gao, S. K. Bose, and J. M. McCord, "Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation," *Molecular aspects of medicine,* vol. 32, no. 4-6, pp. 234-246, 2011.

[332] P. Hiebert *et al.*, "Nrf2-mediated fibroblast reprogramming drives cellular senescence by targeting the matrisome," *Developmental cell,* vol. 46, no. 2, pp. 145-161. e10, 2018.

[333] C. Yu and J.-H. Xiao, "The Keap1-Nrf2 system: A mediator between oxidative stress and aging," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity,* vol. 2021, no. 1, p. 6635460, 2021, doi: https://doi.org/10.1155/2021/6635460.

[334] W. Xu, Y. Luo, J. Yin, M. Huang, and F. Luo, "Targeting AMPK signaling by polyphenols: A novel strategy for tackling aging," *Food & Function,* vol. 14, no. 1, pp. 56-73, 2023, doi: 10.1039/D2FO02688K.

[335] M. Chen, C. Zhang, N. Zhou, X. Wang, D. Su, and Y. Qi, "Metformin alleviates oxidative stress-induced senescence of human lens epithelial cells via AMPK activation and autophagic flux restoration," *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* vol. 25, no. 17, pp. 8376-8389, 2021, doi: https://doi.org/10.1111/jcmm.16797.

[336] S. Theodoropoulou *et al.*, "Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) inhibits the growth of retinoblastoma in vivo by decreasing angiogenesis and inducing apoptosis," *PloS one,* vol. 8, no. 1, p. e52852, 2013.

[337] D. L. Williamson, D. C. Butler, and S. E. Alway, "AMPK inhibits myoblast differentiation through a PGC-1α-dependent mechanism," *American*

Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, vol. 297, no. 2, pp. E304-E314, 2009.

[338] F. Gao, J. Chen, and H. Zhu, "A potential strategy for treating atherosclerosis: improving endothelial function via AMP-activated protein kinase," *Science China Life Sciences,* vol. 61, pp. 1024-1029, 2018.

[339] C. Liang, B. J. Curry, P. L. Brown, and M. B. Zemel, "Leucine modulates mitochondrial biogenesis and SIRT1-AMPK signaling in C2C12 myotubes," *Journal of nutrition and metabolism,* vol. 2014, no. 1, p. 239750, 2014.

[340] R. Liu-Bryan, "Inflammation and intracellular metabolism: new targets in OA," *Osteoarthritis and Cartilage,* vol. 23, no. 11, pp. 1835-1842, 2015.

[341] M. Cai, C. Ding, X. Cao, F. Wang, C. Zhang, and Y. Xian, "Label-free fluorometric assay for cytochrome c in apoptotic cells based on near infrared Ag2S quantum dots," *Analytica chimica acta,* vol. 1056, pp. 153-160, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.01.005.

[342] K. C. Zimmermann, C. Bonzon, and D. R. Green, "The machinery of programmed cell death," *Pharmacology & therapeutics,* vol. 92, no. 1, pp. 57-70, 2001.

[343] A. Peña-Blanco and A. J. García-Sáez, "Bax, Bak and beyond—mitochondrial performance in apoptosis," *The FEBS journal,* vol. 285, no. 3, pp. 416-431, 2018.

[344] C. M. Knudson and S. J. Korsmeyer, "Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death," *Nature genetics,* vol. 16, no. 4, pp. 358-363, 1997, doi: https://doi.org/10.1038/ng0897-358.

[345] T. E. Vaskivuo, F. Stenbäck, and J. S. Tapanainen, "Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor-α, and NF-κB in human endometrial hyperplasia and carcinoma," *Cancer,* vol. 95, no. 7, pp. 1463-1471, 2002, doi: https://doi.org/10.1002/cncr.10876.

[346] E. Mavrogonatou and D. Kletsas, "Plant-Derived Senotherapeutics for the Prevention and Treatment of Intervertebral Disc Degeneration and Aging," *Metabolites,* vol. 14, no. 3, p. 146, 2024, doi: https://doi.org/10.3390/metabo14030146.

[347] Y.-M. Chang *et al.*, "Inhibition of cardiac hypertrophy effects in D-galactose-induced senescent hearts by alpinate oxyphyllae fructus treatment," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine,* vol. 2017, no. 1, p. 2624384, 2017.

[348] S. S. Panda *et al.*, "Protective effects of Aporosa octandra bark extract against D-galactose induced cognitive impairment and oxidative stress in mice," *Heliyon,* vol. 4, no. 11, 2018.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. B. Türkoğlu and B. Mansuroğlu, “Development of In Vıtro Premature Agıng Experıment Model” *VI. Internatıonal Halıch Congress on Multıdıscıplınary Scıentıfic Research,* pp 21, 2024

Makaleler

1. B. Turkoglu and B. Mansuroglu, "Investigating the Effects of Chelidonic Acid on Oxidative Stress-Induced Premature Cellular Senescence in Human Skin Fibroblast Cells." *Life,* vol. 14, no. 9, pp.1070, 2024.

Projeler

1. Şelidonik Asit Molekülünün In vitro Oksidatif Stres İndüklü Yaşlanma Üzerine Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi, Prof. Dr. Banu Mansuroğlu, FBA-2021-4494, Temmuz 2021- Temmuz 2024, Araştırmacı.