**T.C.**
**ERCİYES ÜNİVERSİTESİ**
**GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ**
**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

# ASTROSİT HÜCRELERİNDE İNDÜKLENEN SENESENS ÜZERİNE METFORMİNİN ETKİSİ

**Hazırlayan**
**Elif İMRAL DEMİR**

**Danışman**
**Doç. Dr. Gülay SEZER**

**Şubat 2022**
**KAYSERİ**

**T.C.**

**ERCİYES ÜNİVERSİTESİ**
**GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ**
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

# ASTROSİT HÜCRELERİNDE İNDÜKLENEN SENESENS ÜZERİNE METFORMİNİN ETKİSİ

**Yüksek Lisans Tezi**

**Hazırlayan**
**Elif İMRAL DEMİR**

**Danışman**
**Doç. Dr. Gülay SEZER**

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2020-9880 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Şubat 2022**
**KAYSERİ**

# BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Elif İMRAL DEMİR

İmza:

# YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

**"Astrosit Hücrelerinde İndüklenen Senesens Üzerine Metforminin Etkisi"** adlı **Yüksek Lisans tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi' ne uygun olarak hazırlanmıştır.

| **Tezi Hazırlayan** | **Danışman** |
|---|---|
| **Elif İMRAL DEMİR** | **Doç. Dr. Gülay SEZER** |

**Anabilim Dalı Başkanı**

**Prof. Dr. Zuhal HAMURCU**

**Doç. Dr. Gülay SEZER** danışmanlığında **Elif İMRAL DEMİR** tarafından hazırlanan **"Astrosit Hücrelerinde İndüklenen Senesens Üzerine Metforminin Etkisi"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

08.02.2022

**JÜRİ:** **İmza**

Danışman: Doç Dr. Gülay SEZER

Üye: Prof. Dr. Zuhal HAMURCU

Üye: Doç. Dr. Ahmet ALTUN

**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun …… tarih ve ……. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..../..../2022

**Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

Enstitü Müdürü

# TEŞEKKÜR

Bu tez projesinin planlanması, yürütülmesi ve yazılması hususlarında göstermiş olduğu destek ve yardımlarından ötürü tez danışmanım Doç Dr. Gülay SEZER'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca TYL-2020-9880 proje kodu ile projemi destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve personeline, tez çalışmamın laboratuvar aşamasında arkadaşlığı ile destek olan Dr. Zeynep ÇİFTÇİ'ye, çalışma süresinde yardımını esirgemeyen tüm Genom ve Kök Hücre Merkezi çalışanlarına, çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar gösterip, yaşamımın her döneminde bana duydukları güven ve verdikleri destek için babam İbrahim İMRAL'a, annem Aysel İMRAL'a, kardeşlerime ve sevgili eşim Resul DEMİR'e en derin duygularla teşekkür ederim.

Elif İMRAL DEMİR

Kayseri, Şubat 2022

# "ASTROSİT HÜCRELERİNDE İNDÜKLENEN SENESENS ÜZERİNE METFORMİNİN ETKİSİ"

**Elif İMRAL DEMİR**

**Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü**

**Yüksek Lisans Tezi, Şubat 2022**

**Danışman: Doç. Dr. Gülay SEZER**

## ÖZET

Birçok nörodejeneratif hastalıkta beyindeki astrosit hücrelerinin senesense uğramış oldukları bildirilmiştir. Bu çalışmada iki farklı ajan ile senesensi indüklediğimiz astrosit hücrelerinde, yaygın olarak kullanılan bir antidiyabetik ilaç olan metforminin etkisini in vitro koşullarda araştırmayı amaçladık.

Bu amaçla primer kültürden çoğalttığımız astrosit hücrelerine hidrojen peroksit ($H_2O_2$) ve D-galaktoz (D-gal) uygulamaları ile senesens indüklenerek β-galaktozidazı görüntelemek için X-gal, lipofussinler için Sudan Black B ile boyama yapıldı. Metforminin beyin ve plazmadaki konsantrasyonları (0.75, 7.5, 75 μM) varlığında senesens ile ilgili belirteçler incelendi. Astrosit hücrelerinde p53, p21 ve p16 mRNA ifadeleri qRT-PCR yöntemi ile, reaktif oksijen türlerinin (ROS) düzeyindeki değişim DCFH-DA yöntemi ile ve DNA çift sarmal kırığı tayini histon H2A.X immünofloresan boyaması yapılarak analiz edildi.

Senesens oluşumu hücrelerdeki morfolojik değişim ve histokimyasal boyamalar ile anlaşılmıştır. $H_2O_2$ uygulanan grupta p53 ve p21 mRNA ifadeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artarken metformin uygulanması ile anlamlı şekilde azalmıştır. D-gal uygulanan grupta meydana gelen p21 ve p16 mRNA ifadelerindeki anlamlı artış üzerine metforminin etkisi olmamıştır. $H_2O_2$ uygulaması ROS düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olurken, metformin varlığında belirgin şekilde azalmıştır. D-gal uygulaması ile ROS düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış meydana gelmemiştir. $H_2O_2$ uygulaması ile DNA çift sarmal kırıklarında kontrol grubuna kıyasla artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. D-gal uygulaması ile DNA çift sarmal kırıklarında anlamlı artış meydana gelmiş ancak metformin odak sayısını azaltmada etkili olamamıştır.

Astrosit hücrelerinde $H_2O_2$ ile indüklenen senesenste metformin ROS düzeylerini düşürerek senesens gelişimini engellemiş ancak D-gal üzerinde etkili olmamıştır. Metforminin nörodejeneratif hastalıklardaki olası faydalı etkisinde astrosit hücrelerinde senesens gelişimini engelleyici rölünün in vivo çalışmalar ile desteklenerek araştırılmasında fayda vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Astrosit; D-galaktoz; Hidrojen peroksit; Hücre kültürü; Metformin; Senesens

**EFFECT OF METFORMIN ON SENESCENCE IN ASTROCYTE CELLS**

**Elif IMRAL DEMIR**

**Erciyes University Gevher Nesibe Genome and Stem Cell Institute**

**Master Thesis, February 2022**

**Advisor: Doç. Dr. Gülay SEZER**

## ABSTRACT

It has been reported that brain cells undergo senescence in many neurodegenerative diseases. In this study, we aimed to induce senescence with two different agents in astrocyte cells and to investigate how senescence is affected in the presence of metformin.

For this purpose, hydrogen peroxide ($H_2O_2$) and D-galactose (D-gal) were used to induce senescence in astrocytes and metformin pretreatment was performed to investigate its effect. X-gal was used to stain β-galactosidase and Sudan Black B staining to detect lipofuscins in senescent cells. We analyzed the changes in the p53, p21 and p16 mRNA levels of astrocytes by qRT-PCR and the change in reactive oxygen species (ROS) were by DCFH-DA method. DNA double-strand break determination was analyzed by counting foci per cell by performing histone H2A.X immunofluorescence staining.

Senescence formation was determined by morphological changes in cells and histochemical stainings. While p53 and p21 mRNA expressions increased statistically in the $H_2O_2$ administered group compared to the control group, decreased significantly with metformin administration. Metformin had no significant effect on the D-gal increased p21 and p16 mRNA expressions. While $H_2O_2$ administration caused a significant increase in ROS levels, decreased significantly in the presence of metformin. There was no significant increase in ROS level with D-gal administration. There was an increase in DNA double strand breaks (H2A.X foci) with $H_2O_2$ compared to the control group, but was not significant. Metfromin induced decrease in H2A.X foci number was not statistically significant compared to the $H_2O_2$ group. There was a significant

increase in the H2A.X foci number with D-gal however no significant decrease with metformin pretreatments.

As a result, metformin prevented senescence development by decreasing ROS levels in $H_2O_2$-induced senescence in astrocyte cells, but had no effect on D-gal's. The possible beneficial effects of metformin in neurodegenerative diseases and its role in senesscence of astrocytes need to be investigated by supporting in vivo studies.

**Keywords:** Astrocyte; Cell culture; D-galactose; Hydrogen peroxide; Metformin; Senescence

# İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK ..... i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ..... ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI ..... iii
TEŞEKKÜR ..... v
ÖZET ..... vi
ABSTRACT ..... viii
KISALTMALAR ..... x
TABLO VE ŞEKİLLER LİSTESİ ..... xiii
1.GİRİŞ ve AMAÇ ..... 1
2.GENEL BİLGİLER ..... 2
2.1. Astrosit Hücreleri Nelerdir? ..... 2
2.1.1.Astrositlerin Morfolojileri ..... 3
2.2. Astrositlerin Görevleri ..... 3
2.3. Astrogliozis ..... 5
2.4. Astrositlerin Moleküler Belirteçleri ..... 6
2.5. Alzheimer Hastalığı ve Astrositlerin Rolü ..... 7
2.5.1. Alzheimer Hastalığı ve Diyabet ..... 8
2.6. Metformin ..... 9
2.6.1. Alzheimer Hastalığında Metforminin Rolü ..... 10
2.7. Senesens ..... 11
2.7.1. Astrositlerde Senesens ..... 11
2.7.1.1. Hidrojen peroksit'in ($H_2O_2$) Senesens Oluşturma Mekanizması ..... 15
2.7.1.2. D-Galaktoz'un Senesens Oluşturma Mekanizması ..... 15
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER ..... 17
3.1. Hücre İzolasyonu ve Kültür Çalışmaları ..... 17
3.2. Astrositlerin Karakterizasyonu ..... 18
3.3. Hücre Proliferasyon Testi ..... 19
3.4. Senesens İndüksiyonu ..... 19
3.5. β-galaktozidaz ve Sudan Black B Boyama ..... 20
3.6. ROS Ölçümü ..... 22
3.7. Antifosfo-histon H2A.X İmmünofloresan Boyama ..... 22

3.8. Gen İfade Çalışmaları ..... 23
3.8.1. RNA İzolasyonu ..... 23
3.8.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi ..... 24
3.8.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ..... 24
3.9. İstatistiksel Analizler ..... 25
4. BULGULAR ..... 26
4.1. Primer Kültürde Astrosit Hücreleri ..... 26
4.2. GFAP İmmünfloresan Boyama ..... 26
4.3. Hücre Proliferasyonu ..... 27
4.4. Astrosit Hücrelerindeki Morfolojik Değişim ve Senesens Analizi ..... 30
4.5. Histon H2A.X İmmünofloresan Boyama ..... 31
4.6. ROS Miktarındaki Değişim ..... 35
4.7. p53, p21 ve p16 mRNA İfadeleri ..... 36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ ..... 40
6. KAYNAKLAR ..... 44
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

# KISALTMALAR

AH : Alzheimer hastalığı
ALS : Amyotrofik Lateral Skleroz
AMP : Adenozin monofosfat
AMPK : AMP ile aktive edilmiş protein kinaz
APP : Amiloid öncü proteinin
ATP : Adenozin trifosfat
Aβ : β-amiloid
BACE1 : Beta-sekretaz 1
BSA : Sığır serum albumini
cDNA : Komplementer DNA
DCFH-DA : 2,7-Diklorodihidrofloresein diasetat
DDR : DNA Hasar yanıtı
D-gal : D- galaktoz
DMEM-F12 : Dulbecco's Modified Eagle's Medium ve Ham's F12
DMSO : Dimetil sülfoksit
DNA : Deoksiribo nükleik asit
DPBS : Dulbecco's fosfat tamponlu salin
EAAT : Eksitatör amino asit taşıyıcılar
EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit
EGF : Epidermal büyüme faktörü
FBS : Fetal sığır serumu
FGF : Fibroblast büyüme faktörü
FITC : Floresein izotiyosiyanat
g/l : gram/litre
GFAP : Glial fibriler asitik proteini
GLAST : Glutamat aspartat taşıyıcı
GS : Glutamin sentetaz
H2A.X : H2A Histon Ailesi Üyesi X
$H_2O_2$ : Hidrojen peroksit
HMGB : Yüksek mobilite grubu B
IGF : İnsülin benzeri büyüme faktörü

| | |
|---|---|
| IL | : İnterlökin |
| IL-6 | : İnterlökin-6 |
| iNOS | : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz |
| LRP1 | : Lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein 1 |
| MET | : Metformin |
| MMP | : Matriks metaloproteinazlar |
| mtDNA | : Mitokondriyal DNA |
| MTT | : Metiltiazol difenil tetrazolyum |
| µl | : Mikrolitre |
| µM | : Mikromolar |
| OECs | : Olfactory ensheathing (koku alma) hücreleri |
| OIS | : Onkojene Bağlı Yaşlanma |
| PBS | : Fosfat tamponlu salin |
| PDL | : Poli-D-lizin |
| PP2A | : Protein fosfataz 2A |
| qRT-PCR | : Kantitatif Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksyonu |
| RNA: | : Ribonükleik asit |
| RNS | : Reaktif nitrojen türleri |
| ROS | : Reaktif oksijen türleri |
| SAHF | : Senesens ile ilişkili heterokromatik odaklar |
| SASP | : Senesens ile ilişkili salgı fenotipi |
| SA-β-Gal | : Senesens ilişkili β-galaktozidaz |
| SIPS | : Strese Bağlı Erken Senesens |
| SS | : Standart sapma |
| SSS | : Santral Sinir Sistemi |
| STZ | : Streptozotosin |
| T2DM | : Tip II Diabetes Mellitus |

# TABLO VE ŞEKİLLER LİSTESİ

**Tablo 4.1.** MTT testi ile % canlılık tayini. ..... 29
**Tablo 4.2.** H2A.X antikoru ile boyanan hücrelerin odak/hücre miktarı ..... 34
**Tablo 4.3.** Astrosit hücrelerinde $H_2O_2$ ve D-galaktoz ile oluşan % ROS tayini ..... 36
**Tablo 4.4.** $H_2O_2$ ile indüklenen hücrelerinde p53, p21 ve p16 mRNA ifadeleri ..... 38
**Tablo 4.5.** D-gal ile indüklenen hücrelerin p53, p21 ve p16 mRNA ifadeleri ..... 38
**Tablo 4.6.** Kullanılan laboratuvar ekipmanı, makine ve teçhizatların listesi ..... 50
**Tablo 4.7.** Kullanılan kimyasal ve diğer sarf malzemeler ..... 51

**Şekil 2.1.** Sinir hücresi ..... 2
**Şekil 2.2.** Protoplazmik ve fibröz astrositler ..... 3
**Şekil 2.3.** Normal ve reaktif astrosit hücrelerinin morfolojisi ..... 6
**Şekil 2.4.** Astrosit hücrelerinde senesens ve astrogliozis. ..... 8
**Şekil 2.5.** Metforminin nöronlara etkisi ..... 11
**Şekil 2.6.** Senesens indüklenen hücrede bulunan biyobelirteçler ..... 12
**Şekil 2.7.** Normal hücre ile senesense uğramış hücrenin karşılaştırılması ..... 13
**Şekil 2.8.** Astrositlerde senesens mekanizması. ..... 14
**Şekil 2.9.** D-Galaktoz metabolizması ..... 16
**Şekil 3.1.** Yeni doğmuş sıçan beyni ..... 17
**Şekil 3.2.** Astrosit hücrelerine $H_2O_2$ ve D-gal uygulama protokolü ..... 21
**Şekil 4.1.** Primer kültür astrosit hücrelerine ait fotoğraflar ..... 26
**Şekil 4.2.** Astrosit hücrelerinin GFAP immünofloresan boyama görüntüleri ..... 27
**Şekil 4.3.** MTT ile % canlılık tayini ..... 28
**Şekil 4.4.** Senesens indüklenen astrosit hücreleri ..... 30
**Şekil 4.5.** **S**udan B Black ile boyama sonrası astrosit hücreleri ..... 30
**Şekil 4.6.** Beta galaktozidaz boyaması sonrası astrosit hücreleri ..... 31
**Şekil 4.7.** $H_2O_2$ uygulanan hücrelerde oluşan DNA çift sarmal kırığı (odak) ..... 32
**Şekil 4.8.** D-gal uygulanan hücrelerde oluşan odaklar ..... 33
**Şekil 4.9.** $H_2O_2$ ve D-gal uygulanması ile hücre başına düşen odak miktarı.. ..... 34
**Şekil 4.10.** Astrosit hücrelerinde % ROS miktarı ..... 35
**Şekil 4.11.** $H_2O_2$ ile indüklenen hücrelerin mRNA ifadelerindeki değişim. ..... 37
**Şekil 4.12.** D-gal ile indüklenen hücrelerin mRNA ifadelerindeki değişim. ..... 399

# 1. GİRİŞ ve AMAÇ

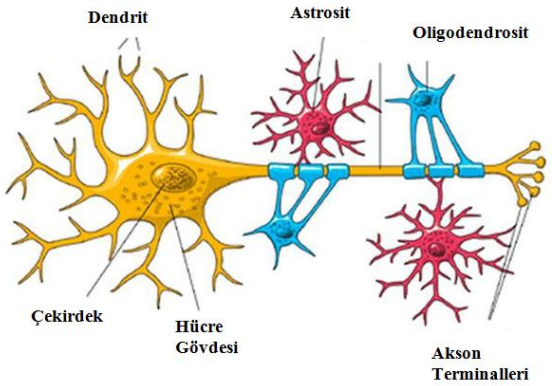
Alzheimer hastalığı (AH) dünyada görülme sıklığı gittikçe artan nörodejeneratif bir hastalıktır. Özellikle nöronlara destek görevi ile bilenen astrositlerin AH'da önemli rollere sahip oldukları bilinmektedir. Astrositler beyinde oluşan tahribatlarda hızla çoğalarak bölgenin iyileşmesi ve fagositoz benzeri işlev yaparak temizlenmesinde görev alırlar (Hennessy ve ark., 2015). Hücresel yaşlanma, yaşlanmanın önemli bir mekanizması olarak yaşa bağlı nörodejeneratif bozuklukların birincil indükleyici faktörü olarak kabul edilmiştir. Senesense uğramış astrositlerin normal fizyolojik fonksiyonlarının azaldığı ve AH'da amiloid-β (Aβ) birikimine, tau hiperfosforilasyonuna ve nörofibriler yumakların birikmesine katkıda bulunan senesens ile ilişkili salgı fenotipi (SASP) faktörlerinin salgılanmasının arttığı gösterilmiştir.

Alzheimer hastalığında başka bir risk faktörü diyabet hastalığıdır (Takeda ve ark., 2010). Diyabet hastalığında kanda glukoz miktarının artması kan-beyin bariyerlerinde Aβ birikime neden olmaktadır. Tip-2 diyabet hastalığı tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve ilk tercih ilaç olan metforminin kandaki glukoz seviyesini düşürmesinin yansıra hafıza, öğrenme ve dikkat iyileştirme gibi etkinlikleri de bildirilmiştir. Mevcut çalışmalar metforminin nörodejeneratif hastalıklarla ilgili modellerde faydalı olabileceğini, beyin dokusunda nöroprotektif etkisinin olduğunu ve diyabetle beraber gelişen nöron hasarını azaltmaya yardımcı olabileceğini göstermektedir (Tanbek, 2015; Hsu ve ark., 2011). Bu bilgiler ışığında bu çalışmada astrosit hücrelerinde senesensi farklı yöntemlerle indükleyerek beraberinde metformin uyguladığında hücrelerdeki senesens ile ilgili belirteçlerin değişip değişmediğini çeşitli yöntemlerle analiz edilmesi amaçlanmıştır.

# 2.GENEL BİLGİLER

## 2.1. Astrosit Hücreleri Nelerdir?

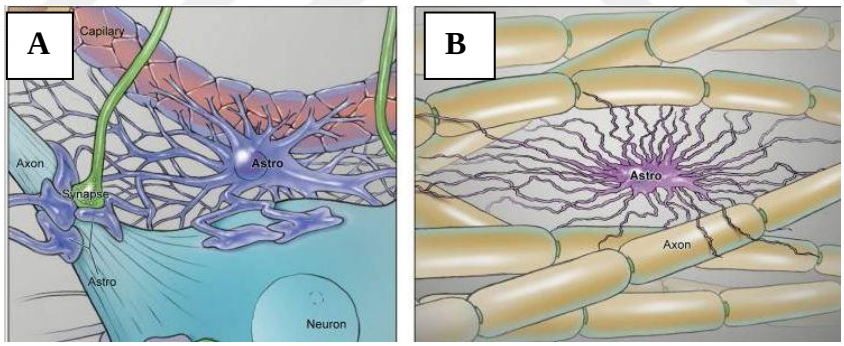
Astrositler (astroglia hücreleri) nöronları destekleyen ve tüm Santral Sinir Sistemi'ni (SSS) düzenli bir şekilde örten başlıca glia hücreleridir (Şekil 2.1) (Sofroniew ve Vinters, 2010). Virchow gliaları ilk olarak sinir tutkalı anlamına gelen nervenkitt ismiyle pasif homojen bir destek hücresi şeklinde tanımlamıştır (Molofsk ve ark., 2012). SSS'nde en yoğun bulunan hücre grubu olup uzun yıllar boyunca beyinde nöronları bir arada tutmaya yarayan destek elemanları oldukları düşünülmüştür. Astrosit terimi ilk olarak 1895 yılında Michael von Lenhossék tarafından kullanılmıştır. Parankimal nöroglia anlamına gelen astrosit terimi, Santiago Cajal tarafından glial fibriller asidik proteini (GFAP) olarak etiketlenerek astrogliaya özgü altın ve civa klorür süblimat boyama tekniğini astrositlerin radyal glia kökeninden olduğunu doğrulamasını sağlamıştır. 19. ve 20. yüzyıllarda bilim insanları glia hücrelerinin sadece nöronların arasındaki boşluğu doldurmakla görevli olduklarını düşünmüşlerdir (Verkhratsky ve Nedergaard, 2018). Oysa son yıllarda, bu hücrelerin SSS'nde birçok yeni işlevlerinin olduğu kabul edilmektedir (Hennessy ve ark., 2015).




**Şekil 2.1.** Sinir Hücresi (Cohen ve Torres, 2019)

### 2.1.1. Astrositlerin Morfolojileri

Astrositler morfolojilerine göre uzun dallanmamış uzantılara sahip protoplazmik astrositler ve kısa oldukça dallanmış uzantıları olan lifli ya da fibröz astrositler olarak ayrılırlar (Şekil 2.2). Protoplazmik astrositler beyinde gri madde içinde bulunurken fibröz astrositler beyaz madde içinde bulunur. Protoplazmik astrositler, yalnızca bir veya iki kan damarları veya SSS sınırları ile temas halinde olan binlerce ince uzantılar ile sinapslara bağlanır (Molofsk ve ark., 2012). Protoplazmik astrositler subpial uç ayaklar oluşturarak pial yüzeye işlemler gönderir. Kemirgen korteksindeki tek bir protoplazmik astrosit, 4−8 nöronla temas eder, 300-600 nöronal dendritleri çevreler ve kendi alanında bulunan 20.000-120.000'e kadar sinapsı korur. Dolaşımdan gelen aminoasit, glukoz, su, oksijen ve iyon gibi maddeler nöronlara astrosit aracılığıyla geçer ve atık maddelerin nöronlardan kapillere geçmesi de aynı yoldan gerçekleşir. Glutamat ve GABA gibi nörotransmitter maddeleri sentezlerler. Fibröz astrositler beynin ve omuriliğin beyaz maddesini doldurmanın yanı sıra optik sinir ve retinanın sinir lifli kısımlarını da doldurmaktadır (Verkhratsky ve Nedergaard, 2018).




**Şekil 2.2. A:**Protoplazmik astrositler **B:** Fibröz astrositler (Molofsk ve ark., 2012)

### 2.2. Astrositlerin Görevleri

Yapılan çalışmalarda astrositlerin iyon homeostazisinde önemli rol oynadığı, birçok nöroaktif bileşik sentezlediği ve salgıladığı, nöronlara metabolik ve trofik destek sağladığı ve toksisiteye karşı koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir. Astrositler hücre içi potasyum ve sodyum gibi iyonların düzenlenmesini sağlar (Sofroniew ve Vinters, 2010). Astrositler nöronların büyümesinde görev alırlar, damarların dış çeperlerine gönderdikleri uzantılar yoluyla damarsal geçirgenliği düzenleyerek kan-beyin bariyerini oluştururlar (Hennessy ve ark., 2015). Astrositler, kan damarlarına yakın ve endotel

hücreleri ile etkileşimleri nedeniyle, kan-beyin bariyerinin korunmasına ve geçirgenliğine de katılır (Fakhoury, 2018). Nöronlarda çoğalma oldukça sınırlı iken astrositler ömür boyunca hızlı bir şekilde çoğalabilirler. Beyinde eğer ki bir tahribat meydana gelirse, astrositler o bölgede hızla çoğalarak bu tahribat sonucu oluşan boşluğu doldururlar (Hennessy ve ark., 2015). Bunlara ek olarak astrositlerin beyin pH'sının kontrolü, antioksidan üretimi ve özel taşıyıcı proteinleri ile glutamat alımı gibi çeşitli beyin fonksiyonlarında temel bir rolü bulunmaktadır (Assefa ve ark., 2018). Canlılar için önemli besin kaynağı olan glikojen astrositlerde depolanır ve glikojenin sentezi ve fosforilasyonu astrositlerde gerçekleşir (Stobart ve Anderson, 2013).

Glutamatı astrositlerde bulunan eksitatör amino asit taşıyıcıları (EAAT) ile taşırlar. Astrositlerde glutamin sentetaz enzimi ile glutamat glutamine dönüştürülür ve bu daha sonra presinaptik terminallere geri gönderilir, orada nörotransmiter glutamatın sentezi için kullanılır. Bu döngüye glutamat-glutamin mekiği denilmektedir ve beyinde glutamat hemostazının düzenlenmesini sağlamaktadır (Assefa ve ark., 2018). Yapılan çalışmada bu glutamat-glutamin mekiğinin AH'nda değişim gösterdiği bildirilmiştir. Hem transgenik farelerde hem de demans hastalarında astrosit glutamat taşıyıcı proteinlerin ekspresyonu azalmış olduğu ve bunun sonucu olarak astrositlerin AH'larında daha az sinaptik glutamat aldığını göstermiştir. Bunlara ek olarak glutamat sentetaz ve omurilikteki glutamat miktarı da hastalarda azalmıştır. Bu durumlar beyinde glutamat hemostazını bozarak astrositlerden nöronlara taşınan glutamat miktarını da düşürür (Stobart ve Anderson, 2013).

Memeliler için önemli besin kaynağı olan glikojen ihtiyaca göre astrositlerde sentezlenmektedir. Glikojenin fazlası olgun astrosit hücrelerinde depolanmakta ve acil ihtiyaç anında fosforilasyonu yapılarak kullanılmaktadır. Yani astrositler glukozun sentezinden ve fosforilasyonundan sorumlu hücrelerdir. Depolama genellikle beyinin gri madde bölgesinde bulunan astrositlerde yapılmaktadır. Artan beyin aktivitesi veya glukozun yetersizliği durumunda bu astrositler glikojeni fosforile ederek kullanılmasını sağlar. Astrositler glukoz taşıyıcı GLUT1 ile glukozu alarak hücre dışına çıkmasını engellemek için glukozu glukoz-6-fosfata fosforiller. Daha sonra glukoz-6-fosfat glukojene dönüştürülür (Stobart ve Anderson, 2013).

Astrositler kan damarları ile çift yönlü etkileşime sahiptir. Yapılan çalışmalar astrositlerin SSS kan damarlarının çapını değiştirebildiğini bu sayede kan akışını hızlandırıp yavaşlatabildiğini göstermektedir (Sofroniew ve Vinters, 2010; Gordon ve ark., 2007).

Astrositler bir yandan kan damarları ile diğer yandan nöronlar, aksonlar ve sinapslarla bağlantılı olduğu için kan damarlarından aldığı glukozu bağlantılı olduğu diğer hücrelere enerji metabolizmalarını sağlamaları için gönderir. Astrositler glikojenin depo yeri olduğundan dolayı artan nöron aktivitesinde ya da hipoglisemi durumunda astrosit bu glikojeni nöronal elementlerin kullanacağı form olan laktata dönüştürerek hücrelerin ihtiyacı olan besini sağlayarak metabolizmayı düzenlenmektedir (Sofroniew veVinters, 2010).

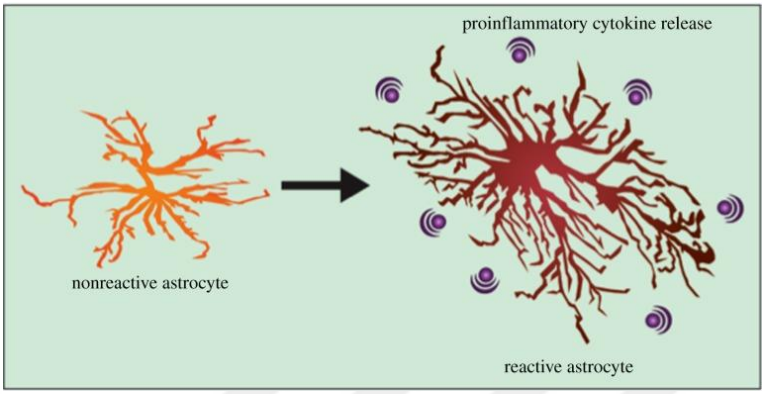
Ayrıca astrositler, fibroblast büyüme faktörü tip 2 (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve sinir büyüme faktörü (NGF) gibi nörotrofinler dahil olmak üzere çeşitli büyüme faktörlerini ve bölgeye özgü bir şekilde birkaç nöropeptidi sentezler ve salgılar (Verkhratsky ve Nedergaard, 2018).

### 2.3. Astrogliozis

Astrositlerin SSS'ndeki hasarda moleküler ve morfolojik değişikliklere uğrayarak cevap oluşturmasına astrogliozis denilmektedir. Yaralanmaya yanıt olarak mikroglia, nöronlar, oligodendrositler, endotelyal hücreler, lökositler ve diğer astrositler tarafından salınan enflamatuar aracılar, astrositin reaktif hale gelmesiyle ilişkili değişiklikleri başlatır. Reaktif astrogliozis sırasında birincil morfolojik değişiklik glial fibriler asit proteini (GFAP) ve ara filaman ekspresyonunun artmasıyla bağlantılı olan süreçlerin hipertrofisidir (Frost ve Li, 2017). Beyin hasarının bir sonucu olarak astrositlerin fonksiyonel ve morfolojik değişimi ve bunun sonucu GFAP ve vimentin gibi yapısal astrosit proteinlerinin artan gen ekspresyonu ile karakterize edilmesi astrogliosiz ya da reaktif astrogliozis olarak adlandırılmaktadır (Assefa ve ark., 2018).

Reaktif astrogliozis hasarlı bölge için bazen faydalı bazen de zararlı etkiler oluşturabilirler. Hasarlı bölgede onarım yapmak için reaktif oksijen türleri veya bazı inflamatuvar sitokinler üretirken nörotoksik olabilir (Şekil 2.3) (Frost ve Li, 2017). Reaktif astrogliozun şiddetlerine göre hafif, orta ve şiddetli astroglioz şeklinde

sınıflandırması ve hepsinde fizyolojik değişimlerin farklı olduğu bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Sofroniew ve Vinters, 2010).




**Şekil 2.3.** Normal ve reaktif astrosit hücrelerinin morfolojisi (Frost ve Li, 2017).

### 2.4. Astrositlerin Moleküler Belirteçleri

İmmünohistokimyasal teknikler, moleküler belirteçlerin saptanmasını sağlayan, sağlıklı ve patolojik dokudaki hücreleri tanımlamak için gerekli araçlardır (Sofroniew ve Vinters, 2010). Hasara uğrayan astrosit hücresi aktif hale geçerek birçok proinflamatuar sitokin salgılamak süreti ile hasarlı bölgenin onarımı için harekete geçer (Frost ve Li, 2017). GFAP ve vimentin gibi astrosit ara filamentleri hücre sinyalleşmesinde ve hücre göçünde oldukça önemli role sahiptir. Astrositlerin tanımlanmasında çok önemli olan GFAP ekspresyonu bir belirteç haline gelmiştir (Khakh ve ark., 2017; Sofroniew ve Vinters, 2010). GFAP ekspresyonu, SSS yaralanmalarına cevap olarak reaktif astrositlerin güvenilir bir belirteci olarak kabul edilebilir (Sofroniew ve Vinters, 2010). Fakat bulunduğu bölgeye göre farklı görev ve yapılarda olan astrositlerde GFAP miktarı ve ekspresyonu değişiklik göstermektedir (Khakh ve ark., 2017).

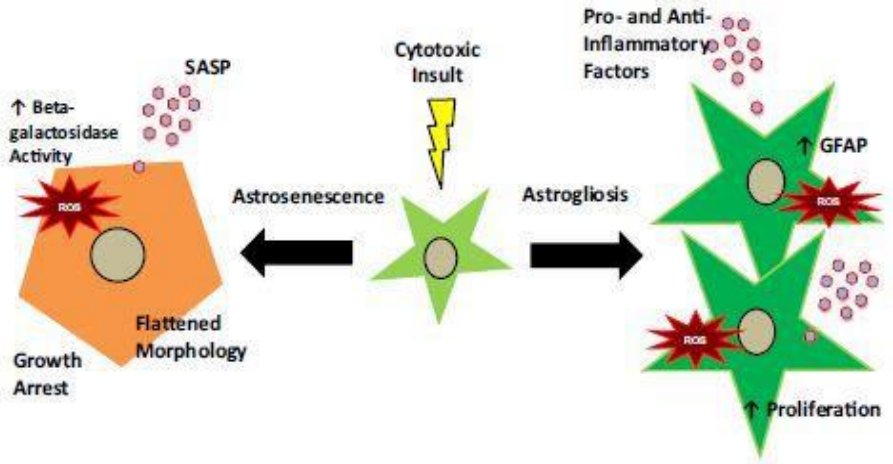
Astrositlerin alt popülasyonlarının belirlenmesinde glutamat taşıyıcısı olan GLAST ve GLT-1 doğum sonrası astrosit öncüllerinin oluşumunda ifade edilmekte ve astrositler için belirteç olarak kullanılabileceği saptanmıştır. Yapılan bir çalışmada GLAST serebellum, hipokampus ve omurilikte eksprese edilirken, GLT-1 korteks, hipokampusun gri maddesinde ve omurilikte eksprese edildiği saptanmıştır. Astrositlerin ve bunların öncüllerinin saptanmasında diğer belirteçleri arasında FGFR3, FABP7 / BLBP ve Sox9 bulunmaktadır (Chaboub ve Deneen, 2012).

## 2.5. Alzheimer Hastalığı ve Astrositlerin Rolü

Nörodejeneratif bir hastalık olan AH beynin belirli bölgelerinde nöron kayıplarına yol açmaktadır. Hafıza ve diğer kognitif fonksiyonlarda ilerleyen bozulma ile karakterize olan bir hastalıktır. Bu hastalık 65 yaş üstü kişilerde % 8 sıklıkla görülmektedir ve hasta sayısı giderek artmaktadır. AH'da nöronal kayıp ve demansa yol açan olay beyinde β-amiloid (Aβ) oluşumu ve sonuçta hücre dışı amiloid plaklarının birikmesine yol açtığı düşünülmektedir (Fakhoury, 2018). Aβ üretimi, amiloid öncü proteinin (APP), Beta-sekretaz 1 (BACE1) ve sekretaz enzimleri tarafından proteolitik bölünmesi ile oluşmaktadır. Bir diğer patolojik bulgu ise tau proteinlerinin nöronlarda birikmesi ile oluşan nörofibriler yumakların oluşmasıdır (Stobart ve Anderson, 2013). Tau proteinleri ağırlıklı olarak aksonlarda ifade edilirken, oligodendrositler ve astrositlerde düşük seviyelerde ifade edilir (Maragakis ve Rothstein, 2006).

Beyindeki Aβ miktarı doğuştan gelen bir bağışıklık ile düzenlenmektedir. Fakat yaşlanma ile glial ekspresyonu artar ve bunun sonucu Aβ birikmesi AH'nın ilerlemesinde önemli rol oynar (Frost ve Li, 2017). Aβ birikmesi veya bir hasar sonucu aktifleşen astrositler ayrıca IL-1, IL-6 ve TNF-α dahil inflamatuar sitokinlerin ekspresyonuna katılarak AH'daki nörodejeneratif süreçleri teşvik eder. Bu inflamatuar sitokinlerin çoğu insan AH beyin örneklerinde ve AH'nin transgenik fare modellerinde artan şekilde eksprese edilir (Fakhoury, 2018; Frost ve Li, 2017). IL-6, yaşlanan hücrelerin temizlenmesi ve lokal inflamatuar yanıtları indüklemek için diğer proinflamatuar sitokinlerle birlikte hareket edebilir. Yaşlanma AH için birinci risk faktörüdür. Yaşlanma süreci, hücresel stresin artması ve strese cevap yollarının uyarılması ile ilişkilidir ve bu süreç telomer disfonksiyonu, DNA hasarı, oksidatif stres ve onkogen aktivasyonu gibi çeşitli olaylar tarafından tetiklenebilen geri dönüşü olmayan bir büyüme durmasıdır (Bhat ve ark., 2012). Yaşlı hücreler, senesens ile ilişkili salgı fenotipi (SASP) olarak adlandırılan değiştirilmiş bir salgı profili gösterir (Haigis, Marcia C. and Yankner, 2010). Hücresel yaşlanmanın protein salgılanmasındaki artışla bağlantılı olduğu gösterildiğinden SASP olarak adlandırılmıştır. İnterlökinler, kemokinler ve diğer inflamatuar mediatörler, örneğin matriks metaloproteinazlar (MMP) ve nitrik oksit gibi proinflamatuar faktörlerin SASP'de salgılanan ana bileşenler olduğu gösterilmiştir (Campisi, 2005). Stres kaynaklı hücresel yaşlanmanın biyolojik belirteçleri, p16INK4a ve yaşlanmayla ilişkili β-galaktosidazın (SA-β-Gal)

ekspresyonunun artmasıdır (Şekil 2.4). SA-β-Gal ve siklin bağımlı kinazların bir inhibitör proteini olan p16INK4a, yaşlanmanın biyobelirteçlerini temsil ettiği kabul edilir (Salminen ve ark., 2011). Yaşlanan hücreler, geri dönüşü olmayan bir hücre döngüsü durmasına ve dolayısıyla mitojenik uyaranlara yanıt veremez hale gelirler. Yaşlı hücreler ayrıca SA-β-Gal aktivitesi, yaşlılıkla ilişkili heterokromatin odakları, hücre döngüsü inhibitörlerinin sürekli ekspresyonu, p21 / CDKN1A ve p16 / CDKN2A gibi genç ve sağlıklı hücrelerde bulunmayan çeşitli özellikler gösterir (MacIel-Barón ve ark., 2018).




**Şekil 2.4.** Astrosit hücrelerinde senesens ve astrogliozis (Cohen ve Torres, 2019)**.**

### 2.5.1. Alzheimer Hastalığı ve Diyabet

AH birinci risk faktörü yaşlanma iken bunu takip eden ikinci risk faktörü ise diyabettir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar diyabet hastalarının Alzheimer olma riskinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Diyabet modeli oluşturulan transgenik farelerde beyinde Aβ birikiminin artış gösterdiği ve insülin tedavisi uygulandığında bu birikimin normale döndüğü bildirilmiştir (Devi ve ark., 2012). Epidemiyolojik çalışmalar, Tip II Diabetes Mellitus (T2DM) ile Alzheimer hastalığı arasında güçlü bir ilişki olduğunu ve nörobiyolojik çalışmalar AH bireylerin SSS'nde insülin direncinin varlığını öne sürmüştür. Bu ilişki göz önüne alındığında, kan-beyin engelini geçebilen insülin duyarlılaştırıcı bir ilaç olan metforminin, Alzheimer hastalığı için bir hastalık modifiye edici veya semptomatik tedavi olarak faydalı olacağını öne sürmüşlerdir. Metformin

kullanımına bağlı hafıza, öğrenme ve dikkat iyileşmeleri gözlemlenmiştir (Koenig ve ark., 2017).

### 2.6. Metformin

Biguanid türevi olan metforminin kimyasal yapısı 1,1-dimetilbiguanid ve formulü $C_4H_{11}N$'dir. *Galega officinalis* (Keçi sedefiotu, Fransız leylağı) bitkisinin 1772 yılında Avrupa'da diyabetin semptomlarını iyileştirdiği fark edilmiştir. Bitkinin guanidin bakımından zengin oluşu ve guanidinin kan glikoz seviyesini düşürdüğü 1918'de bulunmuş ancak klinik kullanım için toksik olduğu tespit edilmitir. 1920'li yıllarda, biguanidler diyabet tedavinde kullanım için araştırılmış ancak insülinin keşfinin gölgesinde kalmıştır. Metformin 1950'lerde Avrupa'da, 1995 yılında ise ABD'de kullanım için onaylanmıştır (Bailey, 2017; Goodman ve Gilman, 2009; Lv ve Guo, 2020).

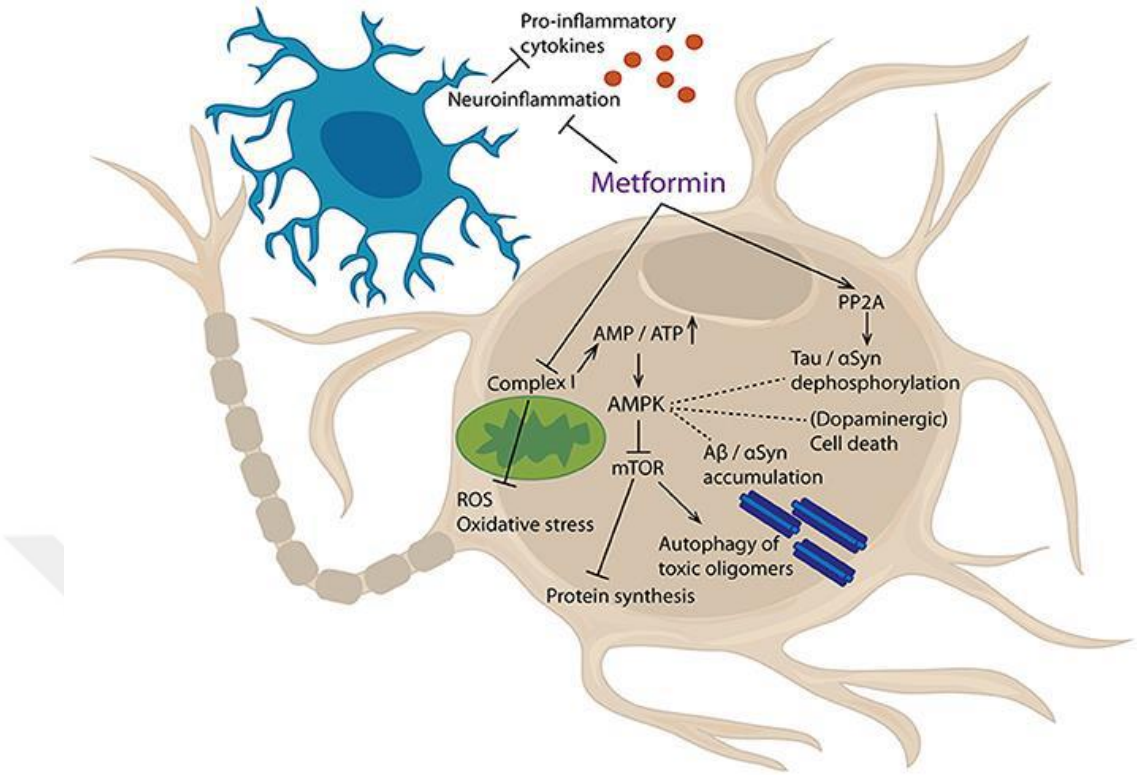
İnsülin duyarlılığını artırıcı bir ajan olan metformin Tip II DM hastalığında antihiperglisemik olarak yaygın bir şekilde kullanılmakta ve ilk sıra tedavi olarak görülmektedir. Glukoz düzeylerini esas olarak karaciğerde glukoz yapımını azaltarak, kas ile yağlarda insülinin etkilerini artırarak ve ince barsaklardan glukoz emilimini azaltarak düşürür (Goodman ve Gilman, 2009). Metforminin elektron taşıma zincirinde kompleks 1 ekspresyonunu yavaşlatıp buna bağlı olarak ATP sentezini azalttığı belirtilmiştir. Bu durumda artan adenozin monofosfatın (AMP) kasların kandan glukozu almasını sağlayan AMP-ile aktive edilmiş protein kinaza (AMPK) bağlanmakta ve enzimin yapısal olarak değişmesini sağlayarak AMPK'nın katalitik etkisini arttırmaktadır (Goodman ve Gilman, 2009; Barzilai ve ark., 2016). Metformin ince bağırsaklardan emilir, plazma proteinleri ile bağlanmaz, 2 saatlik yarılanma ömrüne sahiptir ve idrar ile atılır. Tip II DM'de tavsiye edilen günlük maksimum dozu 2.5 g'dır (Goodman ve Gilman, 2009).

Metformin hipoglisemi yapıcı etkisinin olmaması, kilo aldırmaması, bazı vasküler komplikasyonları önleyebilmesi, ciddi yan etkilere sahip olmaması ve ucuz olması gibi avantajlara sahip bir ilaçtır. İlave olarak metforminin yaşlanmaya karşı koruyucu etkisinin olduğu da öne sürülmektedir (Barzilai ve ark., 2016). En iyi bilinen etki mekanizmaları; kompleks1'i ve mTORC'u inhibe etmesi, IGF-1 sinyalini azaltması, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin azalmasına, DNA hasarını

engellemesi gibi birçok etkisinden dolayı yaşlanmayı geciktirerek ömrün uzayabileceği savunulmaktadır (Liu ve ark., 2011; Batandier ve ark., 2006; Duca ve ark., 2018; Algire ve ark., 2012).

### 2.6.1. Alzheimer Hastalığında Metforminin Rolü

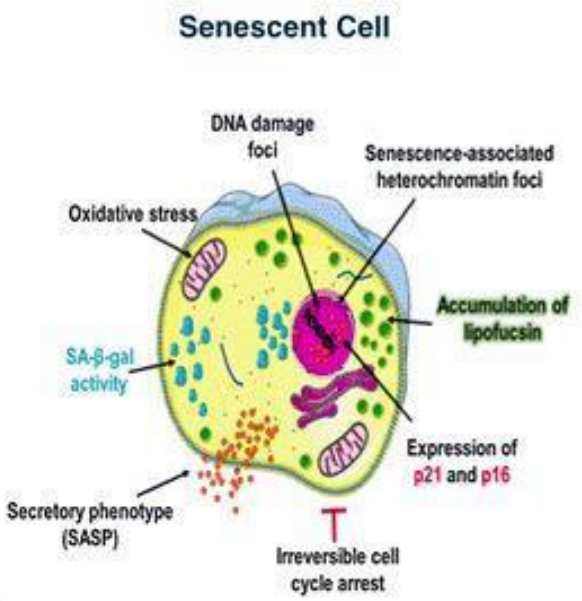
Metformin AMPK aktivasyonu ve mTORC inhibisyonu yapmaktadır; kompleks 1'i inhibe ederek AMP / ATP oranını artırır ve bu mTor sinyallemesini engelleyen AMPK'nin aktivasyonuna yol açar. Ayrıca metformin, protein fosfatez 2A (PP2A)'yı aktive ederek nöroinflamatuar süreçleri baskılayabilir. Bu olayların sonuçları, pro-inflamatuar sitokinlerin ve ROS üretiminin azalması, oksidatif stresin azalması, protein sentezinin inhibisyonu ve toksik oligomerlerin artan otofajisidir (Şekil 2.5). Mevcut çalışmalar metforminin nörodejeneratif hastalıklarla ilgili modellerde faydalı olabileceğini göstermektedir (Hsu ve ark., 2011). Tanbek metformin'in beyin dokusunda nöroprotektif etkisinin olduğunu ve diyabetle beraber gelişen nöron hasarını azaltmaya yardımcı olduğunu göstermiştir. Hipokampüs bölgesinde yapılan histolojik incelemeler ile metforminin nöron dejenerasyonunu azaltarak nöroprotektif etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Metformin antioksidan ve nöroprotektif etkisi ile nöropati gelişimini ve bilişsel fonksiyon bozukluklarının gelişimini engellemeye yardımcı olabildiğinden de bahsedilmiştir (Tanbek, 2015). Śmieszek ve arkadaşları tarafından yapılan ex-vivo çalışmada metformin uygulanan hayvanlardan elde edilen, astrosit ve schwan hücrelerine benzer özellik gösteren hücrelerde senesens ile ilgili hücresel belirteçlerin ve ROS'ların azalmış olduğu ve canlılığın artmış olduğu bildirilmiştir (Śmieszek ve ark., 2017).




**Şekil 2.5.** Metformin'in nöronlara etkisi (Rotermund ve ark., 2018)

## 2.7. Senesens

Hücresel senesens bir hücrenin belli sayıda bölündükten sonra bölünme yeteneğini kaybetmesi yani hücre bölünmesinin kalıcı olarak durmasıdır. İn vitro hücresel yaşlanma, organizmasal yaşlanmanın altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmak için kullanışlı bir modeldir. İn vitro olarak hücre yaşlanmasını hızlandırmak ve kısa sürede gerçekleştirmek için hücreler bir takım maddeler ile indüklenir. Hücrelerin strese karşı geri dönüşümsüz olarak hücre döngüsünü durdurması bu hücrelerde bir takım biyobelirteçler oluşturur (Şekil 2.6) (Wang ve ark., 2013; Sreekumar ve ark., 2020) .



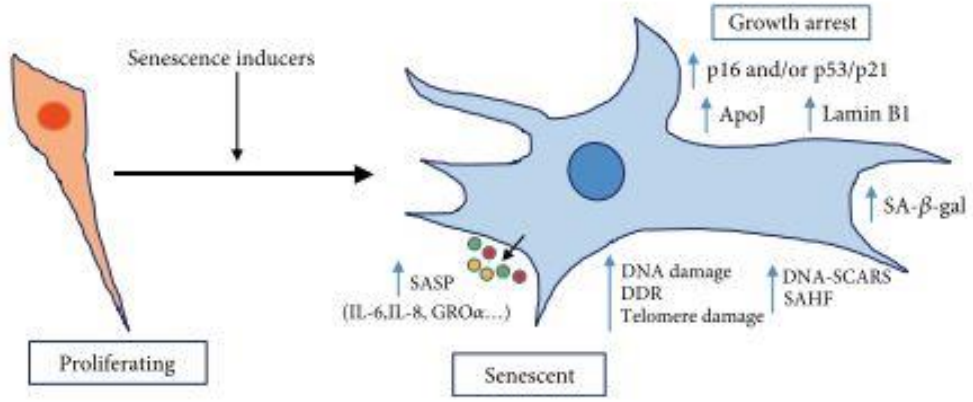

**Şekil 2.6.** Senesens indüklenen hücrede bulunan biyobelirteçler (MacIel-Barón ve ark., 2018).

Somatik hücrelerin ortak bir özelliği olan replikatif senesens, hücre proliferasyonunun geri dönüşümsüz olarak durması ve hücre fonksiyonlarının değişmesi ile gerçekleşmektedir. Replikatif senesens telomer kısalması ile indüklenmektedir. Kısa sürede senesensi indüklemek için serbest radikallere ($H_2O_2$ -hidrojen peroksit veya tert-butil hidroperoksit) ya da kemoterapötiklere (doksorubisin, sisplatin gibi) maruziyet yöntemi kullanılmaktadır. Bu şekilde ajanlar kullanılarak yapılan yaşlanmaya Strese Bağlı Erken Yaşlanma (SIPS) denilmektedir. DNA'yı hasara uğratarak hücreyi senesense götüremeye DNA Hasarına Bağlı Yaşlanma (DDR) denilmektedir ve bleomisin veya doksorubisin gibi ajanlar kullanılmaktadır. Başka bir yaşlanma türü olan Onkojene Bağlı Yaşlanma (OIS) onkojen aktivasyonuyla gerçekleşmektedir (Sreekumar ve ark., 2020).

### 2.7.1. Astrositlerde Senesens

Strese bağlı senesensin hücrelerde SA-β-gal aktivitesinin, p53 ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri olan p21 ve p16 INK4a'nın ekspresyonlarının artışı ile karakterize olduğu gösterilmektedir (Şekil 2.7) (Crowe ve ark., 2016). Ayrıca interlökin-6 (IL-6) sekresyonunda p38MAPK'ya bağlı bir artış görülmüştür. Yaşlanan astrosit hücrelerinde stresle ilişkili olan p38MAPK aktivesinin artışı aynı zamanda IL-6'nın da artışına sebep

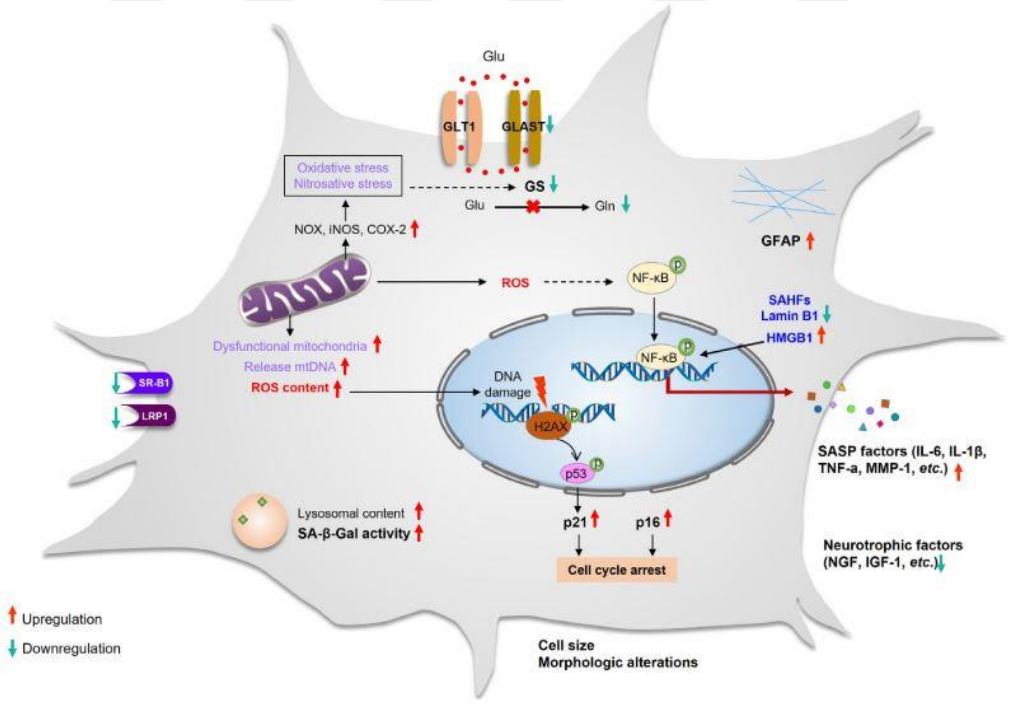
olmaktadır. Çünkü IL-6, yaşlanan hücrelerin temizlenmesinde yardımcı olmak için diğer sitokinlerle birlikte hareket etmektedir (Bhat ve ark., 2012). Ayrıca P38MAPK, hem p53 hem de p21CDKN1'in aktive edilmesiyle doğrudan veya p16INK4A'nın aktivasyonu ile dolaylı olarak hücre döngüsü durmasına aracılık edebilir. p38 aktivasyonuyla p53'ü aktifleştiren bir stresör olduğu için, iki yol birlik olarak hareket edebilir. Telomer disfonksiyonu ayrıca p38 ve p38 aktivasyonuyla p53'ü aktifleştiren bir stresör olduğu için, iki yol sinerjik olarak hareket edebilir. Bu, p38'i hücresel yaşlanmanın indüklenmesinde çok önemli bir yere yerleştirir (Alimbetov ve ark., 2016). Senesent hücrelerde biyobelirteç haline gelen lipofussin; oksitlenmiş protein, bozulmuş lipid kalıntıları ve lizozomal enzimlerin parçalayamadığı metal katyonlardan oluşan salgıdır. Yaşla birlikte biriken lipofussine spesifik olarak bağlanabilen Sudan Black B kimyasal bir bileşiktir ve yaşlanmış hücrelerde lipofussinler ile bağlanarak tespit edilmelerinde kullanılmaktadır (Kritsilis ve ark., 2018).




**Şekil 2.7.** Normal hücre ile senesense uğramış hücrenin karşılaştırılması (Sreekumar ve ark., 2020)

Astrositlerin çeşitli streslere karşı bütün hücreler gibi benzer yaşlanma programı başlatmasına 'astrosenesence' denilmektedir (Cohen ve Torres, 2019). Yaşlanan astrositler, hücre döngüsünün kalıcı olarak durması, hücre morfolojisini değişmesi, GFAP ve vimentin ekspresyonunun artması senesens ile ilişkili heterokromatik odakların (SAHF'ler) oluşumu, yüksek mobilite grubu B (HMGB) proteinlerinin yukarı ekspresyonu, Nükleer lamina protein lamin B1'in ekspresyonunun azalması, nörotrofik büyüme faktörlerinin aşağı regülasyonu ve SA-β-Gal'in yanı sıra SASP faktörlerinin

yukarı regülasyonu ve kromatin değişiklikleri gibi temel özellikler sergilemektedir (Han ve ark., 2020). Yapılan bazı çalışmalarda astrositlerin; iyonlaştırıcı radyasyon, $H_2O_2$ ve D-galaktoz gibi kimyasallar ile indüklenerek ve proteozom inhibisyonu gibi çeşitli yöntemlerle senesense sürüklendiği gösterilmiştir (Turnquist ve ark., 2019; Bhat ve ark., 2012; Kim ve Kim, 2020; Bi ve ark., 2008). Astrositler oksidatif strese karşı hassastır ve düşük dozlarda $H_2O_2$, diğer hücre tiplerine kıyasla yaşlanma programını başlatmak için yeterlidir (Crowe ve ark., 2016). Yaşlanmış astrositler diğer hücrelerden farklı olarak kalıcı hücre döngüsü tutuklanması sergiler. Hücre döngüsü tutuklanmasına uğramış ve genişlemiş yaşlı astrositler de GFAP ekspresyonu artarken, glutamat taşıyıcılarının (GLAST) ve SR-B1 ve LRP1 ekspresyonu azalmıştır. Lizozomal içerik artmıştır ve lizozomlar yüksek β-galaktosidaz aktivitesine ve yüksek ROS seviyeleri üreten ve mitokondriyal DNA salan disfonksiyonel mitokondriye sahiptir. DNA hasarında, SAHF'leri ve laminB1'in kaybı nedeniyle hücrenin nükleer bütünlükleri bozulur (Şekil 2.8). Artmış ROS, NF-κB yolunu aktif hale getirir ve buda SASP üretimini destekleyerek nörotrofik faktörlerin salgılanması azaltır (Han ve ark., 2020).




**Şekil 2.8.** Astrosit senesens mekanizması. GFAP, glial fibriler asidik protein; GLAST, glutamat aspartat taşıyıcı; GLT-1, glutamat taşıyıcı-1; GS, glutamin sentetaz; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; LRP1, lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein 1; NOX, NADPH oksidaz; ROS, reaktif oksijen türleri; SAHF'ler, senesens ile ilişkili heterokromatik odaklar; SASP, senesens ile ilişkili salgı fenotipi; SR-B1, süpürücü reseptör (Han ve ark., 2020)

#### 2.7.1.1. Hidrojen peroksit'in Senesens Oluşturma Mekanizması

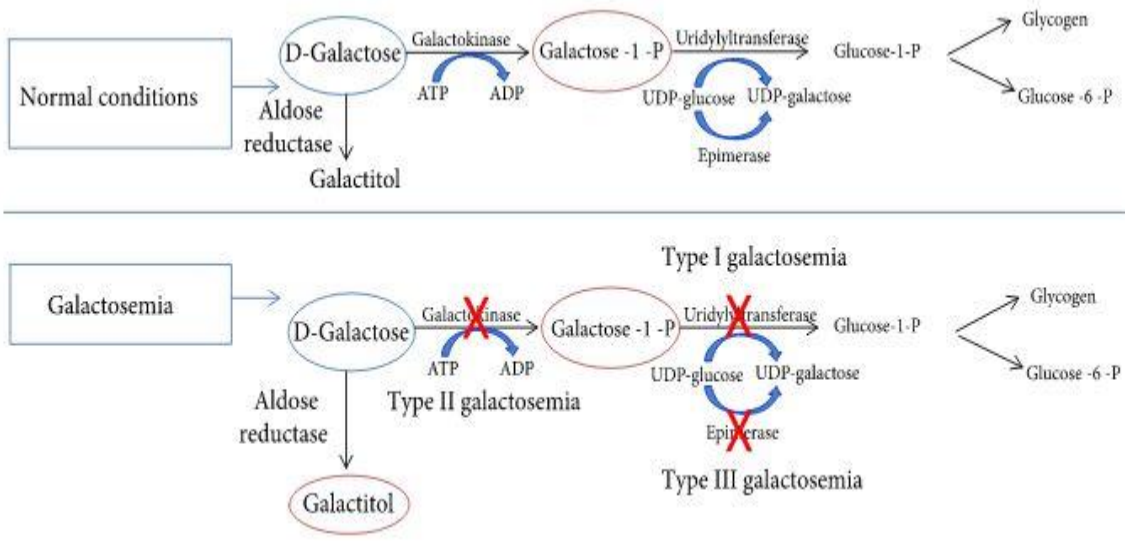
Yaşlanma ve çeşitli nörolojik hastalıklarda oksidatif stresin önemli bir rolü vardır. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlikten dolayı oluşan strese oksidatif stres denilmektedir (Sing ve ark., 2019). Oksijen çoğu organizmanın yaşamı için önemlidir fakat bu tamamen zararsız olduğunu göstermemektedir. Serbest radikaller son yörüngelerinde çiftleşmemiş elektron bulunduran ve bu yüzden kararsız yapılarından dolayı hücre yapısını bozarak bağ kurmaya çalışan atom gruplarıdır. Serbest radikaller organizmanın metabolik aktivitelerini meydana getirirken kendiliğinden oluşurlar (endojen) ve organizmanın yine kendi ürettiği antioksidanlar sayesinde yok edilirler. Bu denge sağlanamadığında oksidatif stres meydana gelmektedir. Serbest radikaller oksijen ve nitrojen kaynaklı olmalarına göre reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak adlandırılmaktadır (Chiurchiù ve ark., 2016).Hem hücre içi hem de hücre dışı ROS'un yaşlanmayı indüklediği bilinmektedir. Mitokondri de elektron taşıma sırasında oluşan atık elektronlar ROS'un oluşumuna sebep olmaktadır. Endojen bir ROS türü olan $H_2O_2$ hücresel yaşlanmanın güçlü bir indükleyicisidir ve oksidatif strese bağlı erken yaşlanmayı kısa bir sürede elde etmek için yaygın olarak kullanılan bir maddedir (Sreekumar ve ark., 2020; Wang ve ark., 2013).

ROS, hücre döngüsü sırasında sinyal molekülleri gibi hareket ederek hücre döngüsünün durmasına, doğrudan Mitokondriyal DNA'ya (mtDNA) zarar vererek ya da telomeraz ters transkriptaz enziminin modifikasyonları ile etkileşerek hücresel yaşlanmayı başlatmaktadır. Ayrıca p53, p21 ve p16 gibi yaşlanma yolaklarını düzenleyen ve belirteç haline gelen genlerin artan ROS'a bağlı olarak ekspresyonlarının arttığı bilinmektedir (Sreekumar ve ark., 2020). CNS yüksek oksijen tüketiminden dolayı bu tür oksidatif strese karşı çok hassastır ve hızlı bir şekilde yaşlanma indüklenerek nörodejeneratif hastalıklar için in vitro bir model oluşturmaktadır.

#### 2.7.1.2. D-galaktoz'un Senesens Oluşturma Mekanizması

D-galaktoz (D-gal) indirgenmiş bir şekerdir. Yüksek dozlarda galaktoz oksidaz varlığında aldoza ve hidroperoksite dönüşebilir ki bunlarda süperoksit anyonu ve oksijen kaynaklı serbest radikal oluşumuna neden olurlar (Hua ve ark., 2007). Ayrıca D-gal'in indirgenmiş bir şeker olarak amin gruplarına affinitesi ileri glikasyon son ürünlerinin birikimine ve ilgili reseptörlerin aktivasyonuna neden olarak oksidatif strese

ve hücresel hasara neden olur (Srikanth ve ark., 2011). Yapılan çalışmalarda D-gal uzun süreli alımlarında hayvanlarda doğal yaşlanma benzeri değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. D-gal hayvanlarda D-galaktokinaz ya da galaktoz-1-fosfat uridil transferaz tarafından metabolize edilmektedir. Fakat D-gal vücutta aşırı şekilde birikirse metabolize edilemez ve galaktitole dönüşür (Şekil 2.9). Galaktitol ise ozmotik basıncı artırarak hücrelerin şişmesine ve işlev bozukluğuna yol açarak yaşlanmaya neden olmaktadır (Xu ve ark., 2020). Aşırı D-gal galaktitol üreten aldoz redüktaz aktivitesini de tetiklemekte ve azalan NADPH glutatyon redüktaz aktivitesinde azalmaya yol açmaktadır. Bunun sonucunda da, hidrojen peroksit gibi farklı serbest radikal türleri ciddi oksidatif hasara neden olarak hücre içerisinde birikmektedirler (Lai K ve ark., 2010). Galaktitol ROS'ları üretebilen ve osmotik stresi uyarabilen aynı zamanda hücrede birikebilen bir bileşiktir. Bu şekilde hücrede biriken galaktitol oksidatif strese ve hasara sebebiyet vermektedir (Serdaroğlu Kaşıkçı ve Gökalp, 2018; Umbayev ve ark., 2020 ).

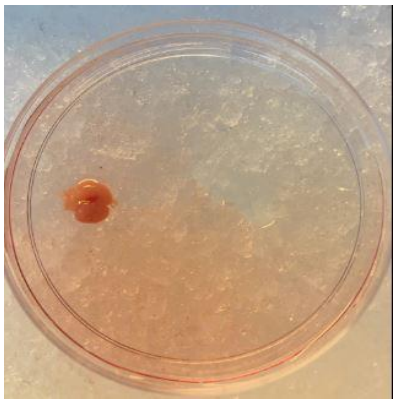



**Şekil 2.9.** D-galaktoz metabolizması (Umbayev ve ark., 2020)

# 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

## 3.1. Hücre İzolasyonu ve Kültür Çalışmaları

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 09.10.2019 tarih ve 19/178 karar no'lu izni ile çalışma gerçekleştirildi. Erciyes Ünv. DEKAM'dan temin edilen yeni doğmuş 1-2 günlük 4 adet Sprague Dawley sıçanların kafaları kesilerek kafa derisinde arkadan öne bir orta hat kesiği yapıldı. Daha sonra kafatasından beyni ayırmak için olfaktör ampullerinden ve serebellum altından iki kesik daha yapılarak çıkarılan beyin buz üzerinde tutulan soğuk Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) içine alındı (Şekil 3.1). Büyüteç altında ince uçlu forseps kullanılarak beynin etrafını saran miyelin kılıfı dikkatlice beyinden soyularak ayrıldı.



**Şekil 3.1.** Yeni doğmuş sıçan beyni

Frontal korteks kısımları çıkarılarak küçük parçalara ayrıldıktan sonra besiyeri içine alındı ve 168 g'de 10 dakika santrifüjlendi. Bundan sonraki işlemler hücre kültürü kabini içerisinde gerçekleştirildi. Süpernatant dökülerek taze besiyeri eklenip pipetaj yapıldı, homojen hale gelen hücre karışımı 37 °C'ye ısıtılmış % 10 fetal sığır serumu (FBS), % 10 at serumu, % 1 penisilin-streptomisin, % 1 glutamax ve amfoterisin B

içeren DMEM-F12 besiyeri içinde flasklara uygulanarak 37° C sıcaklıkta, % 5 $CO_2$ nemli inkübatörde kültüre bırakıldı (Skaper ve ark., 2012).

Astrositlerin izolasyonu için hücrelerin ekim yapılacağı flasklar poli-D-lizin (PDL, 1 mg/10 ml) ile 2 saat 37 °C etüvde bekletilerek kaplama yapıldı. Daha sonra flasklar steril su ile yıkanarak kurutuldu. Flasklara hücre süspansiyonu ve besiyeri eklenerek 37 °C sıcaklıkta ve % 5 $CO_2$ içeren nemli ortamda inkübasyon yapıldı. Flasklar her gün kontrol edildi ve 2. günün sonrasında tutunmalar gözlendi, besiyeri değişimi yapıldı. Flasklar 7. günün sonunda astrositleri saf olarak elde etmek için ayrıştırma işlemine geçildi.

Astrosit hücrelerini saf olarak elde etmek için öncelikle mikrogliaları ayrıştırma işlemi yapıldı. Flaskların ağzı parafinle kapatılarak çalkalayıcıya yerleştirildi. 230 rpm de 3 saat çalkalama yapıldı. Bu işlem sonrasında besiyerine geçen mikroglialar besiyeri uzaklaştırılarak astrositlerden ayrılmış oldu. Daha sonra oligodentrositlerin de kalkması için taze besiyeri eklenerek bir gece boyunca 260 rpm de çalkalamaya devam edildi. Flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra DPBS ile 2-3 kez yıkandı, dipte tutunan astrosit olduğunu düşündüğümüz hücreler tripsin-EDTA aracılığı ile kaldırarak besiyeri eklendi, hücre süspansiyonu 168 g de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek dipte toplanan hücreler besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı. Hücre sayımı tripan mavisi kullanarak thoma lamında yapıldı, hücreler PDL kaplama yaptığımız flasklara ekilerek kültüre devam edildi.

### 3.2. Astrositlerin Karakterizasyonu

İzole edilen astrositlerin karakterizasyonu GFAP immünfloresan boyama yapılarak gerçekleştirildi. 12 kuyucuklu hücre kültür plakalarına cam lameller yerleştirilerek kuyucuk başına $5x10^4$ hücre ekildi. Hücreler % 60 doluluğa ulaşınca kuyucuklardaki besiyerleri uzaklaştırılarak fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Ardından % 3.7 formaldehit ile oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek fiksasyon yapıldı. Formaldehit uzaklaştırılarak kuyucuklar 3 kez PBS ile yıkandı. % 0.3'lük Triton X çözelitisi eklenerek permeabilizasyon yapıldı. Sonrasında % 10'luk sığır serum albumini (BSA) ile bloklama işlemi yapıldı. Bu şekilde oda sıcaklığında 2 saat bekledikten sonra GFAP poliklonal antikoru-FITC konjuge (Bioss, bs-0199R-FITC, 1:200 µl) cam lameller üzerine eklenerek +4 °C de karanlıkta bir gece bekletildi. Ertesi gün yıkama yapılarak

lameller Dapi içeren kapacıtı medium aracılığı ile lamlarla birleştirildi, floresan mikroskobunda fotoğrafları çekildi.

### 3.3. Hücre Proliferasyon Deneyi

48 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına kuyucuk başına $3x10^4$ astrosit hücresi ekimi yapılarak ertesi gün çeşitli konsantrasyonlardaki metformin, $H_2O_2$ ve D-gal uygulaması yapılarak 72 saat inkübe edilmiştir. Sonra kuyucuklara MTT solüsyonu eklenerek kolorimetrik olarak absorbans ölçümü yapılmıştır.

Metforminin suda çözünürlüğü yüksek olduğu için her deney öncesi kültür besiyerinde uygun konsantrasyonda çözerek taze olarak hazırlanmış ve 0.22 µm şırınga filtresi ile filtrelenmiştir. 0.75, 7.5 ve 75 µM konsantrasyonlarda metformin hazırlanarak hücrelere uygulanmıştır. Uygulamadan 72 saat sonra her kuyucuğa 20 µl 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-difenil tetrazolyum bromür (MTT) solüsyonu eklenerek 3 saat 37 °C sıcaklıkta ve % 5 $CO_2$ içeren etüvde inkübe edilmiştir. Canlı hücrelerde bulunan hücresel oksidoredüktaz enzimleri difenil tetrazolyum bromür hücre mitokondrisinde mor renge sahip formazan kristallerine dönüşerek mikroskopta görünmektedir. Bu kristaller 3 saatin sonunda 200 µl DMSO ile çözündürülerek spektrofotometrede (Multiplate Reader Promega Glomax) 560 nm de absorbans ölçülmüştür.

$H_2O_2$ 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda uygulama yapılmıştır. Uygulama yapıldıktan 2 saat sonra $H_2O_2$'li besiyeri uzaklaştırılarak taze besiyeri eklendi ve 72 saat etüvde inkübe edilmiştir. İnkübe süresi bitince yukarıda belirtilen MTT solüsyonu uygulaması yapılarak kuyucukların absorbans ölçümü yapılmıştır.

Suda çözünen D-gal her deneyde taze olarak besiyerinde çözündürülerek ve sonrasında 0.22 µm filtreden geçirilmiştir. Literatür taraması sonucu 10-60 g/L konsantrasyonlarda çalışılmıştır. D-Gal uygulandıktan sonra 72 saat inkübe sonrasında MTT solüsyonu ilave edilerek absorbansı 560 nm de ölçülmüştür. Bütün değerler üç tekrarlı çalışılıp ortalaması alınarak kontrole göre oranlanmıştır. Kontrol grubuna ait absorbans değeri % 100 olarak hesaplanıp diğer gruplara ait absorbanslar kontrol grubuna göre oranlanmıştır.

### 3.4. Senesens İndüksiyonu

24 kuyucuklu plakalara $2.5x10^4$ astrosit hücresi ekilerek hücreler tutunduktan sonra ertesi gün farklı kuyucuklara üç farklı konsantrasyonda (0.75, 7.5 ve 75 µM) metformin

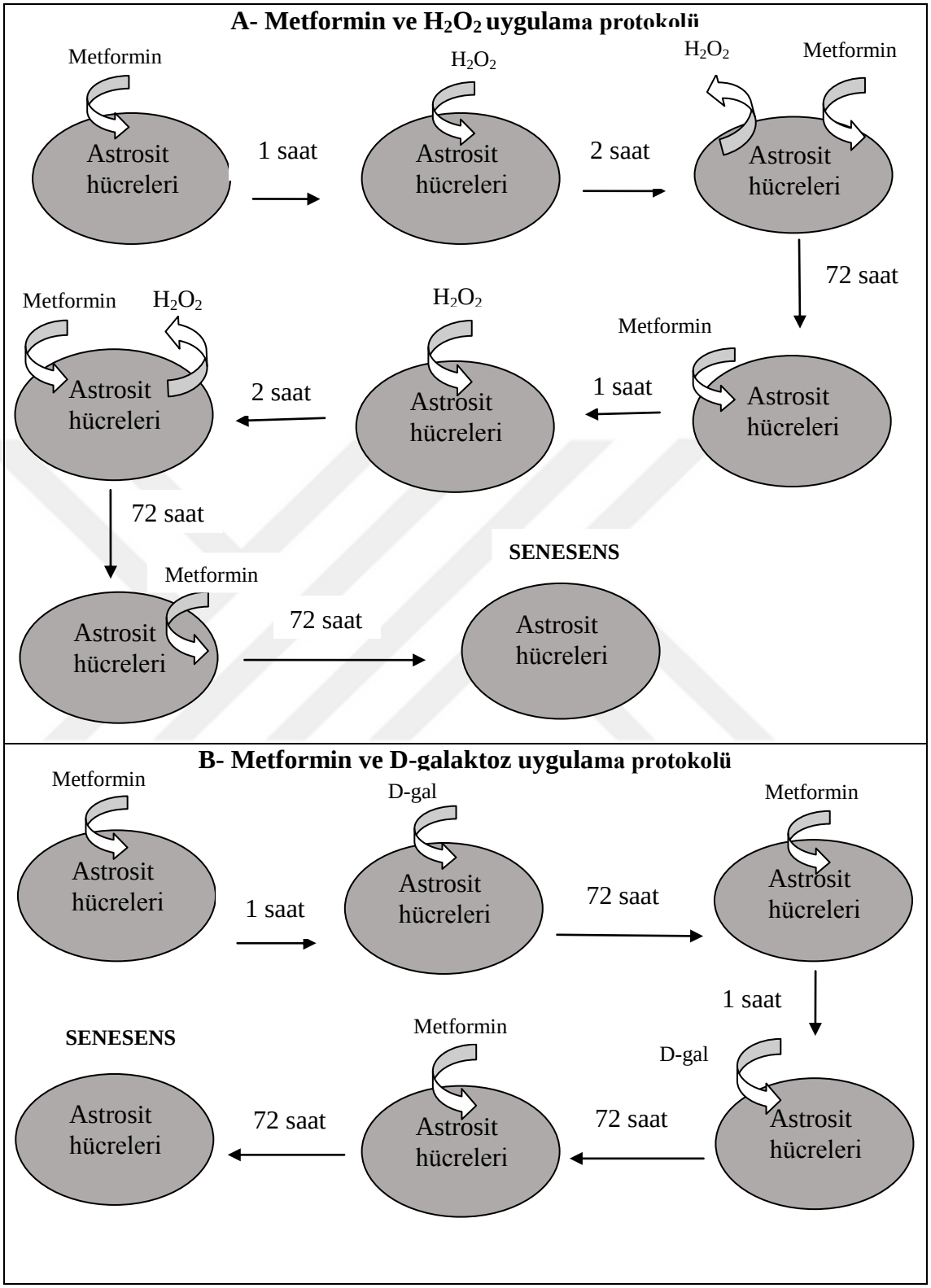
uygulanarak hücreler 37 °C sıcaklıkta ve % 5 $CO_2$ içeren etüvde inkübe edilmiştir. 1 saat sonra $H_2O_2$ (50 μM) kuyucuklara uygulanarak 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. 2 saat sonra $H_2O_2$'yi uzaklaştırmak için kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılıp taze besiyeri eklenmiş ve metformin ilgili gruplara uygulanarak 72 saat inkübe edildikten sonrasında kuyucuklar yine boşaltılarak ikinci kez $H_2O_2$ (50 μM) eklenip 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. 2 saatin sonunda besiyeri boşaltılıp taze besiyeri ile metformin uygulanarak 72 saat daha inkübe edilmiştir. Tekrar besiyeri uzaklaştırılarak sadece metformin eklenip 72 saat inkübe edilen hücreler toplamda 10. gün sonunda deney sonlandırılmıştır (Şekil 3.2).

D-Gal grubunda ise metformin uygulanan gruba 1 saat sonra D-gal (40 g/L) uygulanarak 72 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda kuyucuklardaki besiyerleri boşaltılarak tekrar aynı uygulama yapılmış ve 72 saat daha inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda kuyucuklardaki besiyerleri boşaltılıp bu sefer sadece metformin uygulanarak 72 saat daha inkübe edilmiş, 10. günde deneyler sonlandırılmıştır (Şekil 3.2).

### 3.5. β-galaktozidaz ve Sudan B Black Boyama

24 kuyucuklu plakalardaki hücrelerin besiyerleri uzaklaştırılarak % 3.7'lik formaldehit solüsyonu ile fikse edilmiş ve sonrasında kuyucuklar 3 kez PBS ile yıkanmıştır. β-galaktozidaz boyama için kiti üreten firmanın talimatnamesine göre hazırlanan X-gal solüsyonu ve boyama solüsyonu kuyucuklara eklenerek $CO_2$'siz ortamda 37 °C sıcaklıkta gece boyunca bekletildi. Ertesi gün weller yıkanarak invert mikroskop altında görüntüler alınmıştır.

Filtreden geçirilen Sudan B Black solüsyonu kuyucuklara damlatılarak 10 dakika bekletilmiştir. Kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra çekirdeklerin boyanması için nükleer fast red boyası eklenerek 5 dakika beklenmiştir. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra invert mikroskop altında görüntüler alınmıştır.




**Şekil 3.2.** Astrosit hücrelerine metformin ile A: $H_2O_2$, B: D-galaktoz uygulama protokolü.

### 3.6. ROS Ölçümü

2,7-Diklorodihidrofloresein diasetat (DCFH-DA) floresan özelliği bulunmayan fakat ROS ile reaksiyona girerek oksitlenince floresan ışıma yayan bir maddedir. Ortamda bulunan ROS miktarına bağlı olarak floresan ışıma vermektedir. Astrosit hücreleri 96 kuyucuklu siyah, tabanı şeffaf hücre kültürü plakalarına kuyucuk başına $5x10^3$ sayıda ekilerek hücreler % 60 doluluğa ulaşınca ilgili kuyucuklara 0.75, 7.5, 75 µM metformin uygulanarak 37 °C sıcaklıkta ve % 5 $CO_2$ içeren etüvde inkübe edilmiştir. 1 saat sonra $H_2O_2$ ve D-gal ilgili kuyucuklara eklenmiştir. 2 saat 37° C sıcaklıkta ve % 5 $CO_2$ içeren etüvde inkübe edildikten sonra ilaçlı besiyeri ortamdan uzaklaştırılıp kuyucuklara 10 µM DCFH-DA (Cayman Chemicals, Fransa) eklenerek 30 dakika etüvde bekletilmiştir. Daha sonra kuyucuklar PBS ile yıkanarak kuyucuklara 100 µl DPBS eklenmiştir. Spektrofotometrede eksitasyon 490 nm ve emisyon 510-570 nm dalga boyunda florometrik ölçüm değerleri alınmıştır. Her bir konsantrasyon için 3 kuyucuktan elde edilen değerlerin ortalamaları alınarak kontrol grubu % 100 kabul edilmiş ve kontrol grubuna göre % oran olarak hesaplanmıştır.

### 3.7. Antifosfo-histon H2A.X İmmünofloresan Boyama

Astrosit hücrelerinde DNA hasarı ile oluşan kırıkların tespiti için 12 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına lamel yerleştirilerek kuyucuk başına $5x10^4$ hücre ekilmiştir. Hücreler tutunduktan sonra deney protokolü uygulanarak senesense uğratılan hücrelerden kültür ortamı uzaklaştırılarak PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra % 3.7'lik formaldehit solüsyonu eklenerek 10 dakika bekletilmiş, kuyucuklar tekrar PBS ile yıkanarak formaldehitin etkisi sonlandırılmıştır. Hücre duvarının geçirgenliğini sağlamak için % 0.3 'lük Triton X-100 çözeltisi ile 5 dakika inkübe edilmiş, tekrar PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında % 10'luk BSA çözeltisi eklenerek bloklama yapılmıştır. Bu şekilde oda sıcaklığında 2 saat bekledikten sonra % 1 BSA içinde üretici firmanın talimatnamesine göre hazırlanan antifosfo-histon H2A.X (Ser140) antikoru (bs-3185R, Bioss-ABD, 1:240 µl) lamellere eklenerek +4 °C'de karanlık ortamda bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün PBS ile yıkanan lamellere % 1 BSA çözeltisi ile seyreltilmiş sekonder antikor olan Alexa Fluor 488-Goat Anti-Rabbit IgG (ab150077, Abcam, 1:400 µl) eklenerek 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. PBS ile yıkanan lameller dapi içeren

kapatıcı medium damlatılan lam üzerine kapatılarak floresan mikroskobunda görüntüler alınmıştır.

### 3.8. Gen İfade Çalışmaları

Hücrelerde senesens ile ilgili genlerin ekspresyonlarının yapılan uygulamalar ile nasıl değiştiğinin belirlenmesi için 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına $1x10^5$ astrosit hücresi ekilip ertesi gün $H_2O_2$, D-gal ve metformin uygulamalrından sonra total RNA izolasyonu, elde edilen RNA'dan sentezi ve daha sonra p53, p21 ve p16 genlerine ait relatif mRNA ekspresyonunlarının ifadesi kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile yapılmıştır.

#### 3.8.1. RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için 10. günde kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılıp DPBS ile yıkandıktan sonra trizol (Transgenbiotech, Çin) kullanarak üretici firmanın talimatnamesinde belirttiği şekilde yapılmıştır.

- Her kuyucuğa 1 ml trizol eklenerek hücreler mikrosantrifüj tüpüne alınmış, 5 dk bekletilmiştir.
- 200 µl kloroform eklenerek 30 sn vorteklenip 3 dk bekletilmiştir.
- 10.000 g'de 4 °C'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- Faz ayrımı gerçekleşen tüpte RNA içeren üst şeffaf kısım dikkatli bir şekilde alınarak mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- Tüplere 500 µl izopropanol eklenerek hafif bir şekilde çalkalanıp, 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Tekrar 10.000 g'de 4 °C'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- Üstteki süpernatant dökülüp dipteki pellet 1 ml % 75'lik etanol eklenerek 30 sn vorteklenmiş, 7500 g'de 4 °C'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant dökülerek kalan alkol uçurulmuştur.
- Tüplere kit içinde bulunan solüsyondan 30 µl eklenerek pipetaj yapılmış, buz içine alınarak nanodrop cihazında RNA miktarı, 260/280 nm ve 260/230 nm'deki saflıkları ölçülmüştür.
- Elde edilen RNA'lar -80° C'de saklanmıştır.

### 3.8.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

OneScript Plus cDNA Synthesis Kiti (ABM, Kanada) kullanarak üretici firmanın talimatnamesinde belirttiği şekilde her gruba ait total RNA'lardan alınarak cDNA'ya dönüştürülmüştür. Çalışmanın aşamaları aşağıda belirtildiği şekilde buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

- Kit içerisinde bulunan solüsyonlar ile 'karışım 1' ve 'karışım 2' isimli iki farklı karışım talimatnameye göre hazırlanmıştır. 'Karışım 1'; Oligo(dt), Random primer ve dNTP eklenerek, 'karışım 2'; Reverse Transcriptase, RT buffer ve Nüclease-Free $H_2O$ eklenerek hazırlanmıştır.
- Her tüpe karışım 1'den 2 µl, 1 µg RNA ve nükleaz içermeyen su tüplere eklenerek pipetaj yapılmıştır.
- 65° C'de kuru ısı cihazında 5 dk inkübe edilmiştir.
- Tekrar buza konularak 4 dk bekletilmiştir.
- Her tüpe 5.5 µl 'karışım 2' eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır.
- Tüpler thermocycler (Biomac C1000 touch) cihazına yerleştirilerek;
- Aktivasyon basamağı: 25 °C'de 10 dk
  Denatürasyon basamağı: 50 °C'de15 dk
  Birleşme basamağı: 85 °C'de 5 dk sonrasında tüpler hemen buza konulmuştur.
- Elde edilen cDNA'lar -20 °C'de saklanmıştır.

### 3.8.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Senesens ile ilgili genler olan p53, p21 ve p16 nispi mRNA ifadelerini analiz etmek için housekeeping gen olarak GAPDH kullanılarak Roche Ligthcycler 480 cihazında çalışılmıştır. Son hacim 20 µl olacak şekilde 10 kat seyreltilen cDNA'lardan 4 µl, forward ve reverse primerlerden 1'er µl, 4 µl su ve 10 µl Brightgreen master mix (ABM, Kanada) ile hazırlanan karışımdan 96 kuyucuklu PCR plakasının kuyucuklarına ikili olarak uygulama yapılmıştır. Aktivasyon basamağı 95 °C'de 10 dakika 1 döngü, birleşme basamağı 94 °C'de 20 saniye, 56 °C'de 20 saniye ve 72 °C'de 45 saniye toplamda 40 döngü ve soğuma 67 °C'de 1 saniye koşullarında çalışılmıştır. Cihazdan elde edilen döngü sayısı (Cycle threshold; Ct) değerlerinin ortalamaları alınarak ΔCt, ΔΔCt ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar yapılırken referans gen olan GAPDH'e göre normalize edilmiştir. Sıçana ait p53, p21, p16 ve Gapdh mRNA primer

dizilimleri NCBIgene programı aracılığı ile tasarlanmıştır. Primerlerin dizilimleri aşağıdaki gibidir;

- p16 (70 bp, NM_031550.2), F; 5'GTCGTACCCCGATACAGGTGA3', R; 5'GCACCATAGGAGAGCAGGAG3'
- p21 (104 bp, NM_080782.4), F; 5'TGGTCTTCTGCAAGAGAAAGC3', R; 5'TGAATGAAGGCTAAGGCAGAA3'
- p53 (70 bp, NM_030989.3), F; 5'TCCCCTGAAGACTGGATAACTG3', R; 5'GACTCAGAGGGAGCTCGATG3'
- Gapdh (105 bp, NM_017008.4), F; 5'TACCAAGGCAACTATGGCTTC3', R; 5' CAGCTGGCAGAACAGCTTATT3'

Çalışmada 3 farklı zamanda hücrelerden izole edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar ile yapılan qRT-PCR ile elde edilen Ct'lerden hesaplanan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri yani 'nispi mRNA ifadeleri' istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

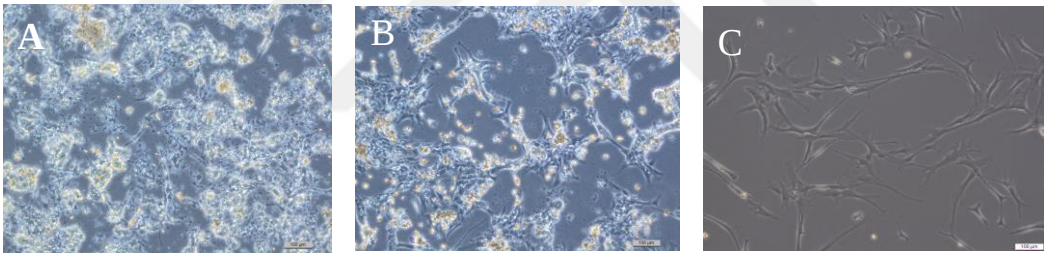
### 3.9. İstatistiksel Analizler

Hücre proliferasyonu (MTT testi), mRNA gen ekspresyon çalışmaları, DNA çift sarmal kırığı tayini (hücre başına düşen odak sayısı) ve ROS miktar tayin deneylerinin farklı zamanlarda üçer tekrarlı olarak çalışılması ile elde edilen verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS programı (versiyon 22.0) kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile analiz edilmiştir. MTT testinde grupların kontrol grubuna göre farklılığı Bağımsız Örneklem t Testi ile analiz edilmiştir. Diğer verilerde çoklu grupların kıyaslanması tek yönlü varyans analiz (ANOVA) testi ile; varyansların homojen olduğu gruplarda post hoc Tukey HSD testi, olmadığı gruplarda ise post hoc Tamhane's T2 testi ile yapılmıştır $P<0.05$ değeri istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Elde edilen veriler aritmetik ortalama ± standart sapma (SS) olarak ifade edilmiştir. GraphPad Prism 6 programı kullanılarak grafikler çizilmiştir.

# 4. BULGULAR

## 4.1. Primer Kültürde Astrosit Hücreleri

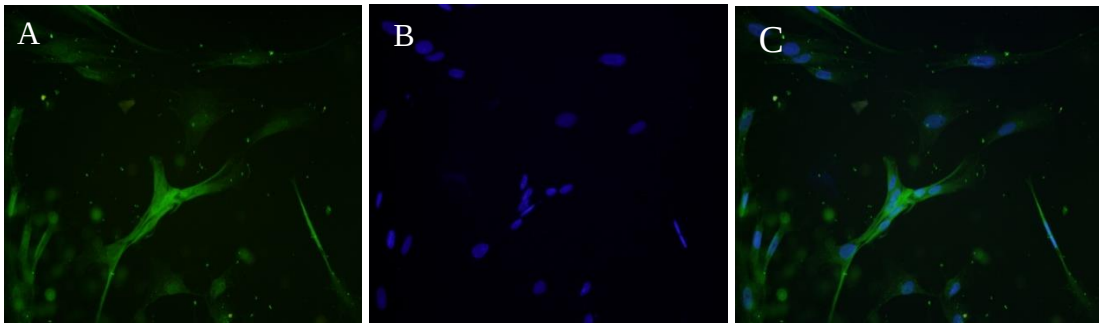
Astrosit hücreleri diğer hücrelerden arındırıldıktan sonra primer hücre kültüründe çoğaltılmaya devam edildi (Şekil 4.1). Astrositlerin flasklara tutunduğu ve morfolojik olarak uzun dallanmış yapıda olduğu invert mikroskopta görülmüştür.




**Şekil 4.1.** Astrosit hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri **A:** Primer kültür 2. gün, **B:** Primer kültür 4. gün **C:** 3. pasaj astrosit hücreleri, (Büyütme: 10x, Scaler)

## 4.2. GFAP İmmünfloresan Boyama

Astrosit hücrelerinin karakterizasyonu ve kültürdeki oranını belirlemek için GFAP proteini antikoru kullanılarak immünfloresan boyama yapılmış ve görüntüler alınmıştır. Rasgele çekilen 11 fotograftan dapi ile boyanan 200 çekirdek sayıldığında 197'sinin GFAP ile boyanmış olduğu tespit edilmiştir. Kültürdeki hücrelerin çok büyük oranda astrosit hücrelerinden (% 98.7) oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 4.2).




**Şekil 4.2.** Astrosit hücrelerinin GFAP immünofloresan boyama görüntüleri. **A**: GFAP FITC ile astrosit hücrelerinin boyanması **B**: Çekirdeklerin Dapi ile boyaması **C**: Çakıştırılmış görüntü.

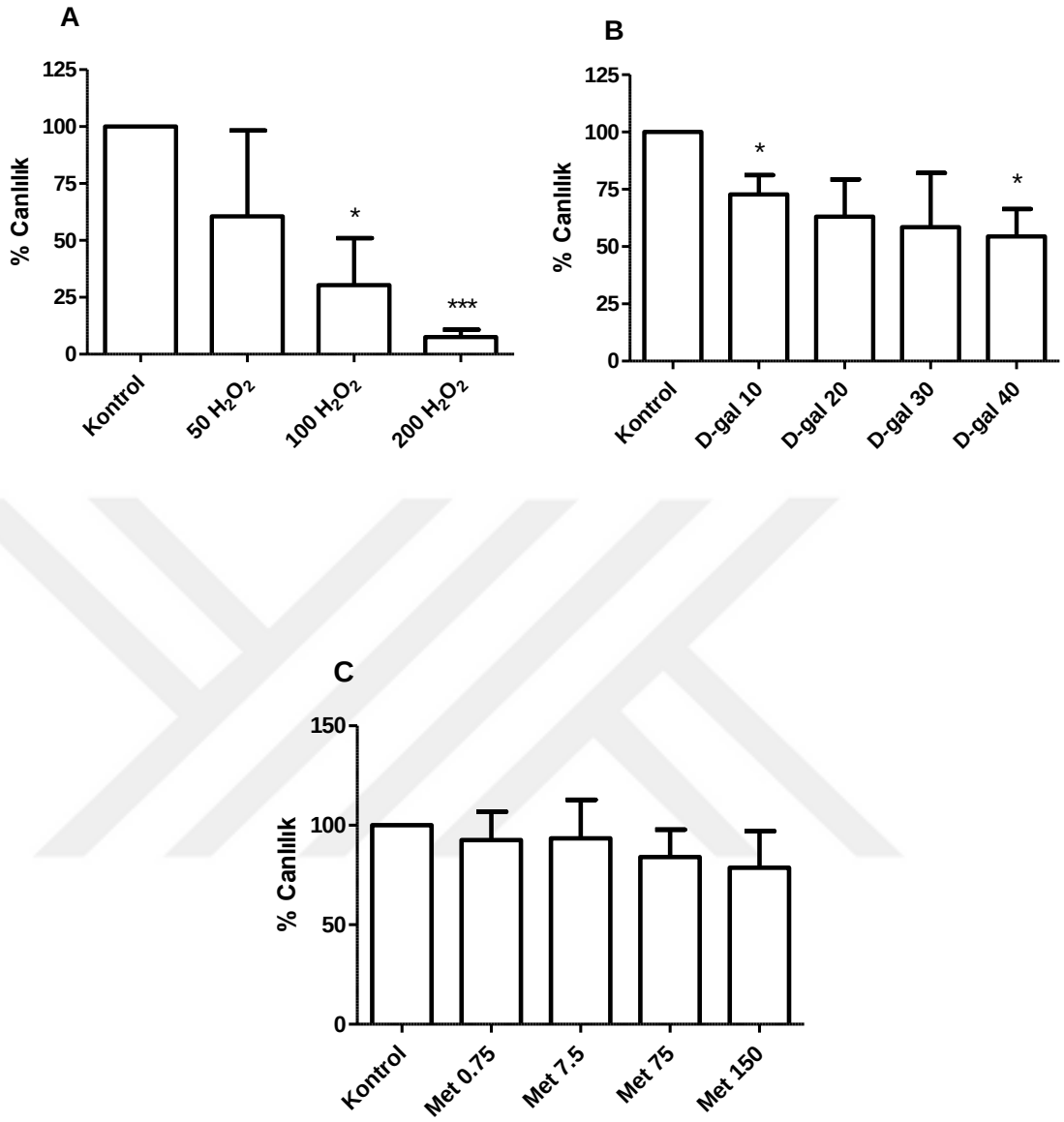
### 4.3. Hücre Proliferasyonu

Astrosit hücreleri 2 saat boyunca 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda $H_2O_2$'ye maruz bırakılıp daha sonra taze besiyeri ile değiştirilerek 72 saat sonra yapılan MTT testi sonucuna göre $H_2O_2$ 100 µm ve 200 µM grubu ile kontrol grubu arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir azalma olmuştur ($p<0.05$). $H_2O_2$ 50 µM ile kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık oluşmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.3- A, Tablo 4.1).

D-gal 10, 20, 30 ve 40 µM konsantrasyonlarda uygulandığında 72 saat sonrasında D-gal 10 ve 40 µM konsantrasyonlarında canlılık açısından kontrol grubuna göre anlamlı farklılık oluşmuştur ($p<0.05$). D-gal 20 ve 30 µM konsantrasyonlu gruplarda anlamlı bir farklılık olmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4.3- B, Tablo 4.1).

Metformin 0.75, 7.5, 75 ve 150 µM konsantrasyonlarında uygulandığında hücre canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde etkilemediği görülmüştür ($p>0.05$) (Şekil 4.3- C) (Tablo 4.1).

Deneyin sonraki kısımları ise $H_2O_2$ 50 µM, D-gal 40 g/l, metformin için 0.75, 7.5 ve 75 µM konsantrasyonları ile çalışılmıştır.



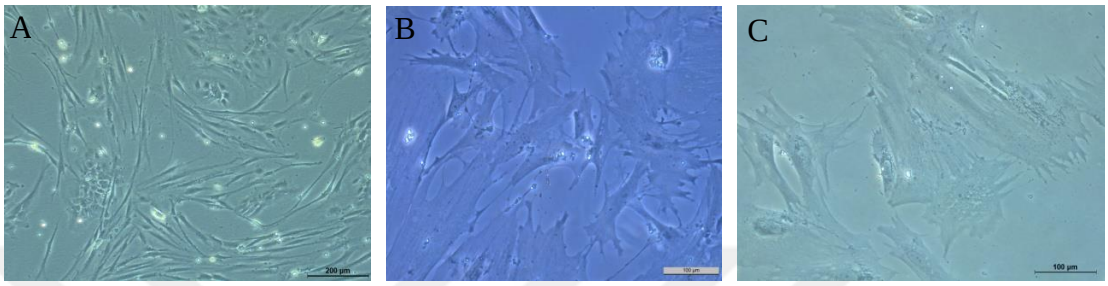

**Şekil 4.3.** Astrosit hücrelerinin **A:** $H_2O_2$ (50, 100, 200 µM), **B:** D-galaktoz (10, 20, 30, 40 g/l) **C:** Metformin (0.75, 7.5, 75, 150 µM) ile muamele sonrası 72. saatte MTT testi ile belirlenen % canlılık değerlerinin aritmetik ortalama ± SS değerleri verilmiştir. * $p<0.05$,** $p<0.01$ .*** $p<0.001$ kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (n=3).

**Tablo 4.1.** Astrosit hücrelerinin $H_2O_2$ (50, 100, 200 µM), D-gal (10, 20, 30, 40 µM) ve Metformin (0.75, 7.5, 75, 150 µM) ile muamele sonrası 72. saatte MTT testi ile belirlenen % canlılık değerlerinin aritmetik ortalama ± SS değerleri ve kontrol grubuna göre *p* değerleri verilmiştir (n=3).

| **GRUPLAR** | **% Canlılık**<br><br>**Aritmetik ortalama ± SS (*p değeri*)** |
|---|---|
| **Kontrol** | 100 ± 0.00 |
| **$H_2O_2$ 50 µM** | 60.57 ± 37.73 (*p=0.212*) |
| **$H_2O_2$ 100 µM** | 30.35 ± 20.65 (*p=0.028*) |
| **$H_2O_2$ 200 µM** | 7.54 ± 3.24 *(p= 0.003)* |
| **D-gal 10 g/l** | 72.71± 8.43 *(p=0.03)* |
| **D-gal 20 g/l** | 63.04± 16.23 *(p=0.059)* |
| **D-gal 30 g/l** | 58.50± 23.58 *(p= 0.093)* |
| **D-gal 40 g/l** | 54.46± 11.98 *(p=0.022)* |
| **Metformin 0.75 µM** | 92.59± 14.27 *(p=0.419)* |
| **Metformin 7.5 µM** | 93.41 ± 19.43 *(p=0.617)* |
| **Metformin 75 µM** | 84.01± 13.74 *(p=0.182)* |
| **Metformin 150 µM** | 78.63 ± 18.39 *(p=0.155)* |

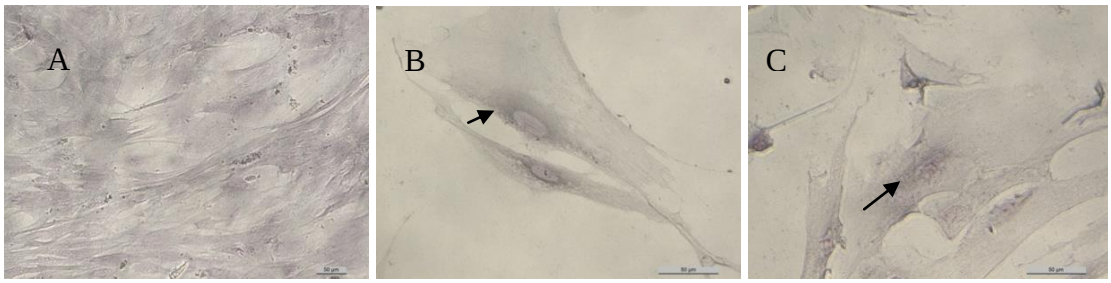
### 4.4. Astrosit Hücrelerindeki Morfolojik Değişim ve Senesens Analizi

Astrosit hücrelerinin normal şekli ince ve dallanmıştır. $H_2O_2$ ve D-gal uygulanan gruplarda senesens gelişimine bağlı olarak hücrelerin sitoplazmalarında genişleme gözlenmiştir (Şekil 4.4).



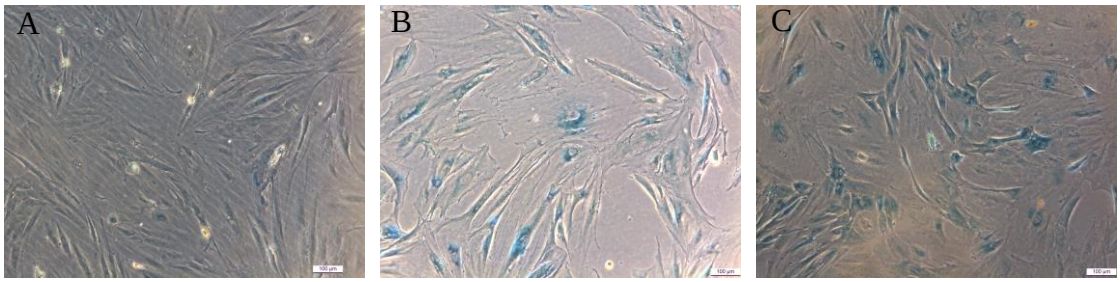

**Şekil 4.4.** Senesens indüklenen astrosit hücreleri **A**: Kontrol (pasaj: 9, 10x büyütme, scale bar: 200 µm) , **B:** $H_2O_2$ ile senesens indüklenen astrosit hücresi (pasaj: 9 büyütme 10x, scale bar: 100 µm) **C**: D-gal ile senesens indüklenen astrosit hücresi (pasaj: 9, büyütme 10x, scale bar: 100 µM)

Hücreler senesense uğradığında lipidlerin, proteinlerin ve metallerin parçalanamayan bir oksidasyon ürünü olan lipofussin birikimi gerçekleşir (Salmonowicz ve Passos, 2017). $H_2O_2$ ve D-Gal uygulanan hücrelerin sitoplazmalarında biriken lipofussin yağ damlacıklarının histokimyasal Sudan B Black boyama yapılarak siyah renkli boyanması ile astrositlerin senesense uğradığı görülmüştür (Şekil 4.5).




**Şekil 4.5.** $H_2O_2$ ve D-gal ile senesensin indüklendiği astrosit hücrelerinde Sudan B Black ile histokimyasal boyama sonrası invert mikroskop görüntüleri. **A:** Kontrol, **B:** $H_2O_2$, **C:** D-gal uygulanan gruplar (20x, Büyütme çizgisi:50 µM) (siyah ok: Sudan B Black ile siyah renge boyanan lipofussinler, çekirdekler ise nükleer fast red boyası ile pembeye boyanmıştır).

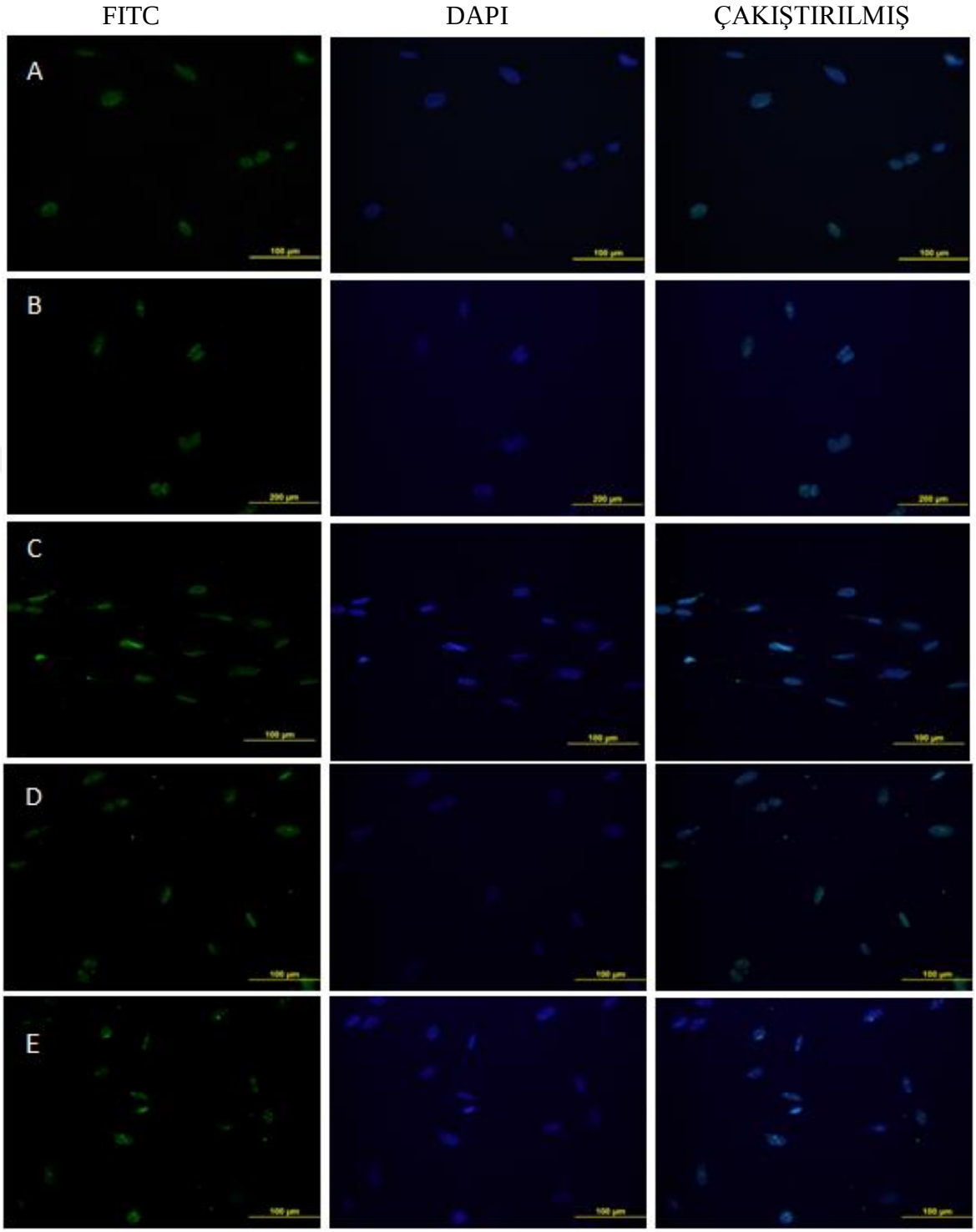
$H_2O_2$ ve D-gal uygulanan hücrelerde β-galaktozidaz boyama sonrası kontrol grubuna kıyasla mavi-yeşil boyanan alanlarda belirgin artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.6).




**Şekil 4.6.** $H_2O_2$ ve D-gal ile senesensin indüklendiği astrosit hücrelerinde β-galaktozidaz boyama sonrası invert mikroskop görüntüleri**. A:** Kontrol, **B:** $H_2O_2$, **C:** D-gal uygulanan grup (Hücre sitoplazmasındaki mavi-yeşil renkler β-galaktozidaz pozitif alanlar). 10x, Büyütme çizgisi: 100 µM

### 4.5. Histon H2A.X İmmünofloresan Boyama

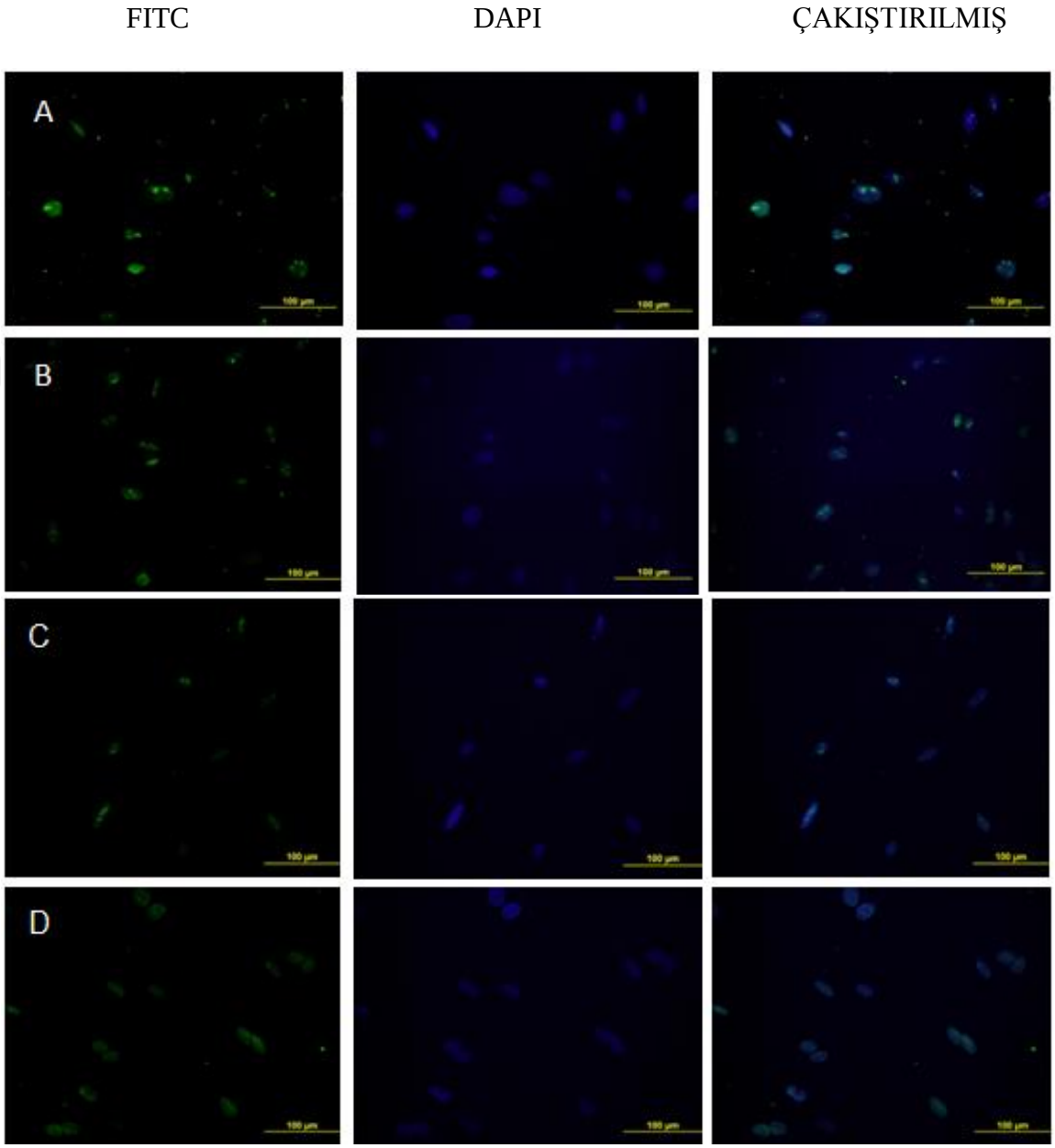
Astrosit hücrelerinde oluşan DNA çift sarmal kırıklarının tespiti için histon antifosfo-H2A.X antikoru ile immünofloresan boyama yapılarak çekirdekte oluşan odaklar (foci) floresan mikroskobunda görüntülenmiştir (Şekil 4.7 - Şekil 4.8). Odaklar sayılarak hücre başına düşen odak miktarlarındaki değişim verilmiştir (Tablo 4.2). $H_2O_2$ uygulaması ile hücre başına düşen odak miktarında artış meydana gelmiş ancak bu artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.465$) (Şekil 4.9-A). Metformin ile ön muamele ise $H_2O_2$'nin meydana getirdiği artışı azaltmıştır ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.797$, $p=0.682$, $p=0.763$).



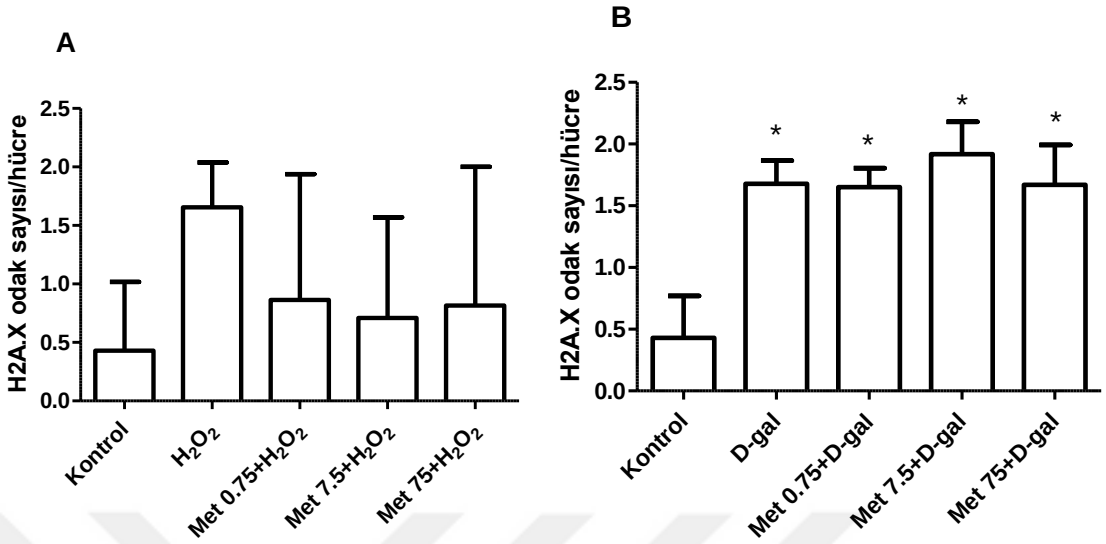

**Şekil 4.7.** Astrosit hücrelerinde $H_2O_2$ uygulaması ile oluşan odakların histon antifosfo-H2A.X immünofloresan boyaması ile floresan mikroskobundaki görüntüleri. **A:** Kontrol, **B:** $H_2O_2$, **C:** Met 0.75 µM + $H_2O_2$, **D:** Met 7.5 µM + $H_2O_2$, **E:** Met 75 µM + $H_2O_2$ uygulanan astrosit hücreleri (40x - 100 µM büyütme çizgisi)

D-gal uygulaması ile hücre başına düşen odak miktarında kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı bir artış olmuştur (p=0.012). Metforminin üç konsantrasyonu da D-gal'in meydana getirdiği odak sayısındaki artışı engelleyememiş ve kontrol

grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık mevcuttur (p= 0.013, p= 0.003, p= 0.012) (Şekil 4.9-B).




**Şekil 4.8.** Astrosit hücrelerinde D-gal uygulaması ile oluşan odakların histon antifosfo-H2A.X immünofloresan boyaması ile floresan mikroskobundaki görüntüleri. **A:** D-gal, **B:** Met 0.75 µM + D-gal, **C:** Met 7.5 µM + D-gal, **D:** Met 75 µM + D-gal uygulanan astrosit hücreleri (40x - 100 µM büyütme çizgisi).




**Şekil 4.9.** Astrosit hücrelerinin $H_2O_2$ ve D-gal uygulanması ile hücre başına düşen DNA çift sarmal kırığı (odak) miktarı gösterilmiştir. **A:** Kontrol, $H_2O_2$ 50 µM, Met 0.75 µM + $H_2O_2$, Met 7.5 µM + $H_2O_2$, Met 75 µM + $H_2O_2$ grupları **B:** Kontrol, D-gal 40 g/l, Met 0.75 + D-gal µM, Met 7.5 µM + D-gal, Met 75 µM + D-gal gruplarının karşılaştırılması. Veriler aritmetik ortalama ± SS olarak verilmiştir (n=3). * kontrol grubuna, # ise $H_2O_2$ veya D-gal grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0.05$). Her bir çalışmada en az 50 hücre sayılarak analiz yapılmıştır.

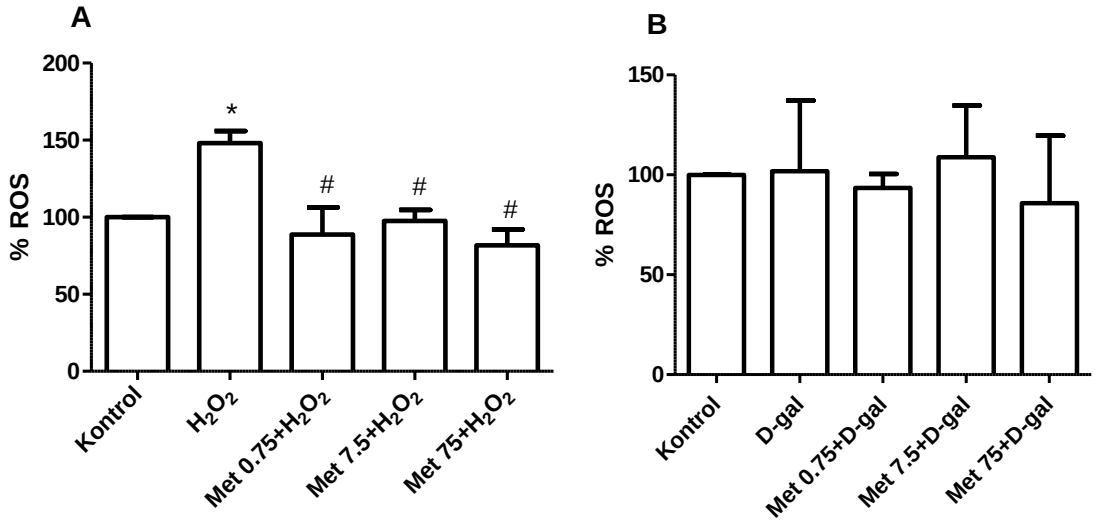
**Tablo 4.2.** Astrosit hücrelerinde hücre başına düşen DNA çift sarmal kırıkları (odak) miktarı H2A.X immonofloresan boyama yapılarak belirlenmşitr. Odak/hücre değeri aritmetik ortalaması ± SS ve kontrol grubuna göre p değerleri verilmiştir.

| **GRUPLAR** | **Odak/hücre değeri**<br>**Aritmetik ortalama ± SS (*p* değeri)** |
|---|---|
| **Kontrol** | 0.43 ± 0.00 |
| **$H_2O_2$** | 1.65 ± 0.38 (*p*=0.465) |
| **Metformin 0.75 µM + $H_2O_2$** | 0.86 ± 1.07 (*p*=0.971) |
| **Metformin 7.5 µM + $H_2O_2$** | 0.70 ± 0.86 *(p=0.994)* |
| **Metformin 75 µM + $H_2O_2$** | 0.81 ± 1.18 *(p= 0.981)* |
| **D-gal** | 1.67 ± 0.32 *(p=0.012)* |
| **Metformin 0.75 µM + D-gal** | 1.65 ± 0.15 *(p= 0.013)* |
| **Metformin 7.5 µM + D-gal** | 1.91 ± 0.26 *(p=0.003)* |
| **Metformin 75 µM + D-gal** | 1.67 ± 0.32 *(p=0.012)* |

### 4.6. ROS Miktarındaki Değişim

Astrosit hücrelerinde ROS miktar tayini florometrik olarak ölçülerek tayin edilmiştir. $H_2O_2$ uygulanan grupta ROS miktarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir (p=0.049) (Tablo 4.3). $H_2O_2$ uygulamasından önce 0.75, 7.5 ve 75 µM metformin ile ön muamele edilen gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık oluşmaz iken (p>0.05) $H_2O_2$ uygulanan gruba kıyasla ROS miktarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar olmuştur (p=0.015, p=0.039, p=0.007). Metforminin konsantrasyonunun artması gruplar arasında belirgin bir farklılık oluşturmamıştır (Şekil 4.10-A).

D-gal uygulanan grupta ROS miktarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana gelmemiştir (p=1.000). D-gal uygulamasından önce 0.75, 7.5 ve 75 µM metformin ile ön muamele edilen gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık oluşmamıştır (p>0.05) (Tablo 4.3). Kontrol, D-gal ve metformin + D-gal gruplarında % ROS değerinin belirgin olarak değişmediği grafikte görülmektedir (Şekil 4.10-B).



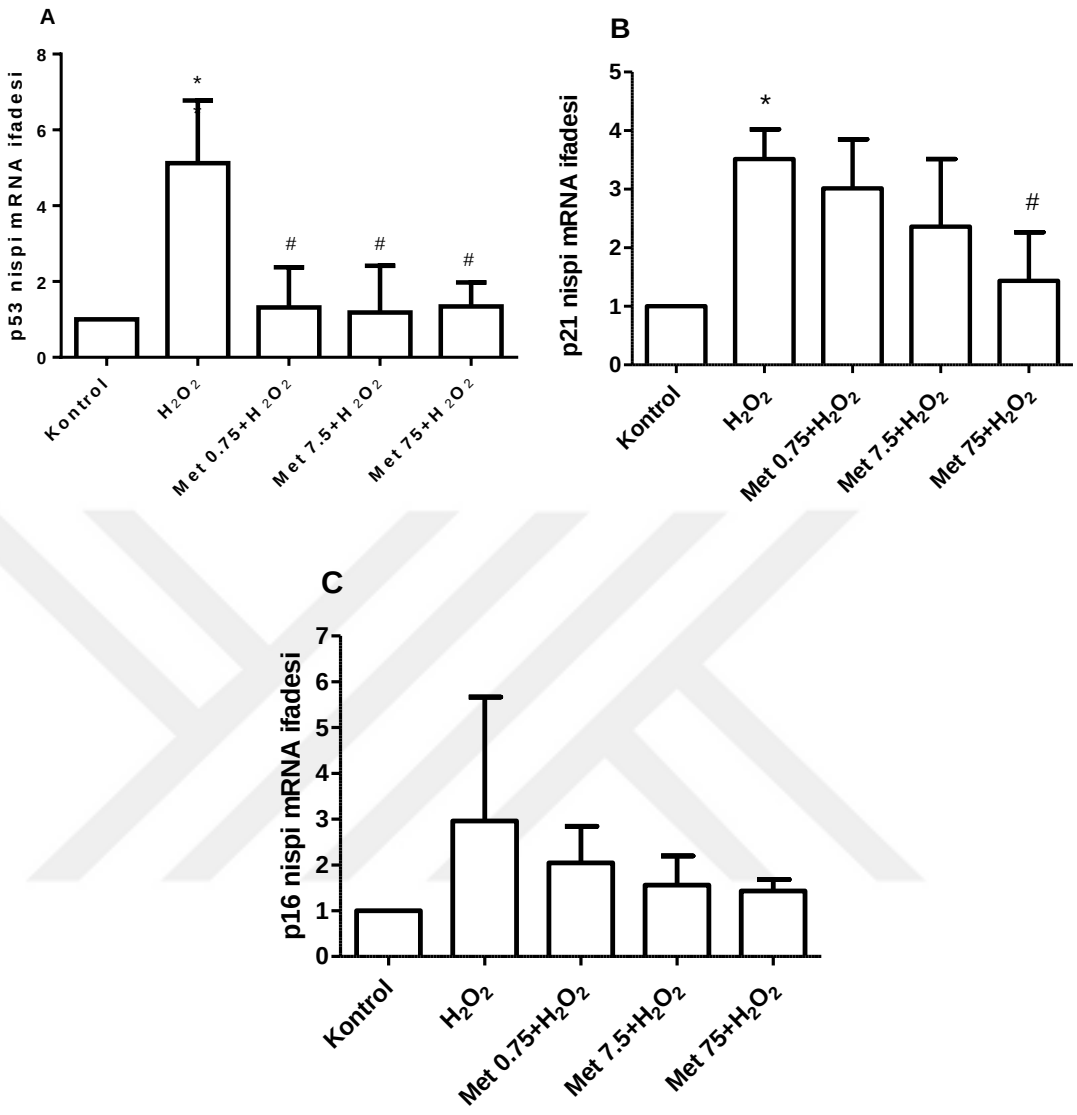

**Şekil 4.10.** Astrosit hücrelerinde $H_2O_2$, D-gal veya metformin ile kombine uygulanması sonrasında oluşan % ROS değerleri. **A:** Kontrol, $H_2O_2$, Met 0.75 µM + $H_2O_2$, Met 7.5 µM + $H_2O_2$, Met 75 µM + $H_2O_2$ grupları, **B:** Kontrol, D-gal, Met 0.75 + D-gal µM, Met 7.5 µM + D-gal, Met 75 µM + D-gal gruplarına ait aritmetik ortalama ± SS değerlerini göstermektedir (n=3). * kontrol grubuna göre, # ise $H_2O_2$ veya D-gal uygulanan gruba göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0.05).

**Tablo 4.3.** Astrosit hücrelerinde $H_2O_2$, D-gal veya metforminin kombine uygulamaları sonrasında oluşan % ROS değerlerinin aritmetik ortalama ± SS değerleri ile kontrol grubuna göre *p* değerleri verilmiştir (n=3).

| **GRUPLAR** | **% ROS Miktarı**<br>**Aritmetik ortalama ± SS (*p* değeri)** |
|---|---|
| **Kontrol** | 100 ± 0.00 |
| **$H_2O_2$** | 148.13 ± 13.33 *(p=0.049)* |
| **Metformin 0.75 µM + $H_2O_2$** | 88.71 ± 30.80 *(p=0.934)* |
| **Metformin 7.5 µM + $H_2O_2$** | 97.62 ± 12.43 *(p= 1.000)* |
| **Metformin 75 µM + $H_2O_2$** | 81.76 ± 17.86 *(p=0.728)* |
| **D-gal** | 101.86 ± 35.31 *(p=1.000)* |
| **Metformin 0.75 µM + D-gal** | 93.49 ± 6.95 *(p=0.997)* |
| **Metformin 7.5 µM + D-gal** | 108.86 ± 25.86 *(p=0.991)* |
| **Metformin 75 µM + D-gal** | 85.84 ± 33.76 *(p=0.954)* |

### 4.7. p53, p21 ve p16 mRNA İfadeleri

Astrosit hücrelerinin $H_2O_2$ veya D-gal ve bunların metformin ile ön muameleleri sonrasında p53, p21 ve p16 gen ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. p53 mRNA ifadesi $H_2O_2$ uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artarken (p=0.006), metforminin her üç konsantrasyonu ile muamele ise $H_2O_2$ grubuna göre anlamlı azalma meydana getirmiştir (p=0.010, p=0.008, p=0.011) (Şekil 4.11-A, Tablo 4.4). p21 mRNA ifadesi $H_2O_2$ uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artarken (p=0.017), 75 µM metformin ile kombine grupta $H_2O_2$ uygulanan gruba göre anlamlı azalma meydana gelmiştir (p=0.049) (Şekil 4.11-B, Tablo 4.4). $H_2O_2$ uygulanması ile p16 mRNA ifadesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış meydana gelmiş (p=0.983), metformin uygulanan gruplarda ise $H_2O_2$ ve kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim olmamıştır (Şekil 4.11-C, Tablo 4.4).




**Şekil 4.11.** Astrosit hücrelerinde $H_2O_2$ ile indüklenen senesenste ilgili genlerin nispi mRNA ifadelerinin metformin varlığında değişimi; **A**: p53, **B**: p21, **C**: p16 nispi mRNA ifadelerinin aritmetik ortalama ± SS değerleri verilmiştir (n=3). * kontrol grubuna göre, # ise $H_2O_2$ grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0.05$).

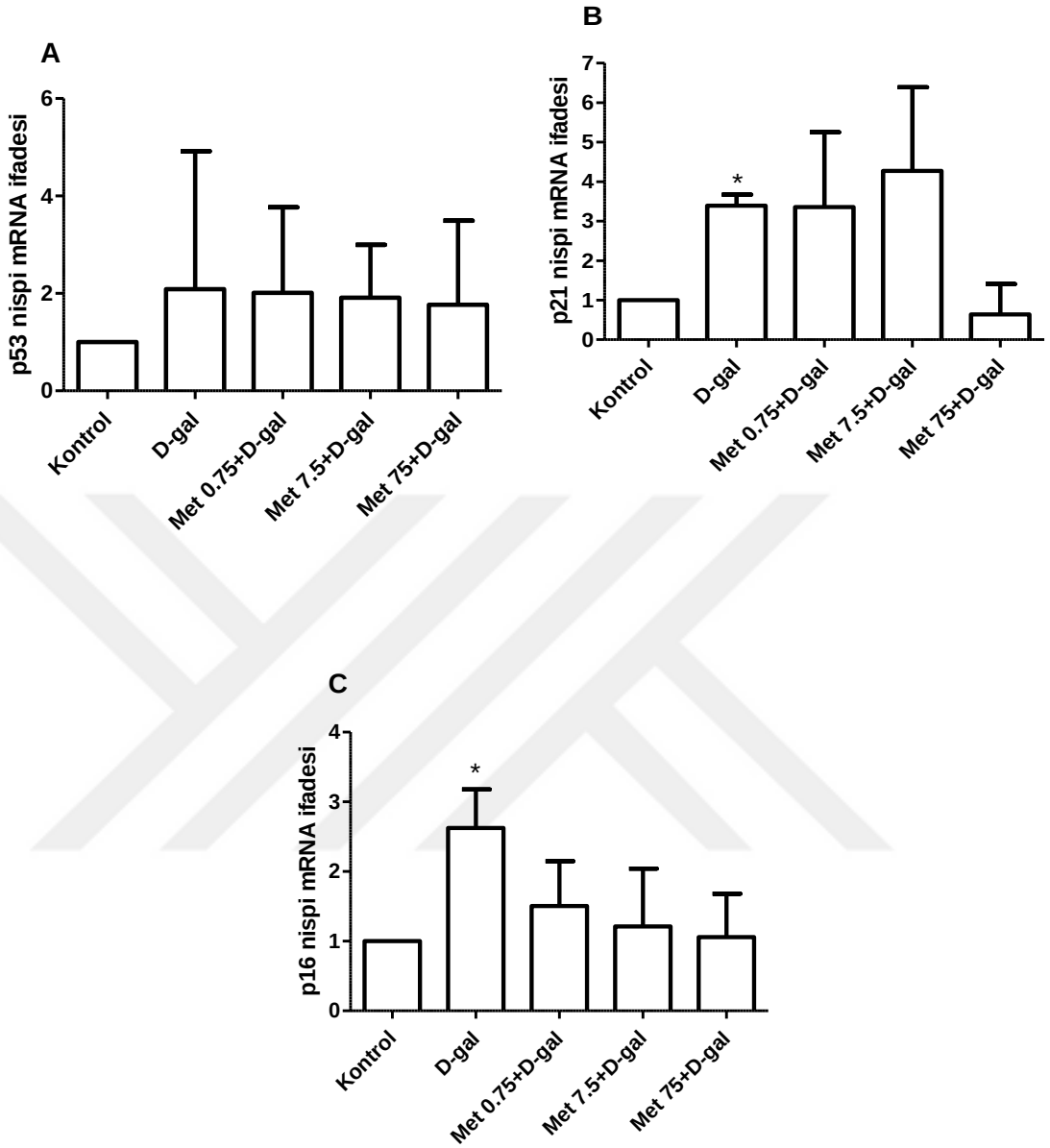
**Tablo 4.4.** Astrosit hücrelerinin $H_2O_2$ veya metforminin kombine uygulanması sonrasında senesens ile ilgili genler olan p53, p21 ve p16'nın nispi mRNA ifadelerinin aritmetik ortalama ± standart sapma (SS) değerleri ile kontrol grubuna göre *p* değerleri verilmiştir (n=3). Satırlarda aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği ifade etmektedir.

| **Genler** | **Gruplar** Nispi mRNA ifadeleri aritmetik ortalama ± SS (*p* değerleri) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Kontrol** | **$H_2O_2$** | **Met 0.75+ $H_2O_2$** | **Met 7.5+ $H_2O_2$** | **Met 75+ $H_2O_2$** |
| p53 | 1.00 ± 0.00 [a] | 5.12 ± 1.66 (p:0.006) [b] | 1.32 ± 1.06 (p:0.996) [a] | 1.18 ± 1.24 (p:0.999) [a] | 1.34 ± 0.64 (p:0.994) [a] |
| p21 | 1.00 ± 0.00 [a] | 3.52 ± 0.51 (p:0.017) [b] | 3.02 ± 0.84 (p:0.058) [a, b] | 2.36 ± 1.15 (p:0.269) [a, b] | 1.43 ± 0.83 (p:0.954) [a] |
| p16 | 1.00 ± 0.00 [a] | 2.96 ± 2.70 (p:0.983) [a] | 2.04 ± 0.80 (p:0.811) [a] | 1.55 ± 0.64 (p:0.956) [a] | 1.43 ± 0.25 (p:0.632) [a] |

p53 mRNA ifadesinin D-gal uygulanan grupta kontrol grubuna göre arttığı görülmüş fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=1.000) (Şekil 4.12-A). Metformin ile muamele edilen gruplarda da D-gal grubuna göre anlamlı bir farklılık oluşmamıştır (p>0.05). Oysaki D-gal astrosit hücrelerinde p21 ve p16 gen ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışlara neden olmuştur (sırası ile p=0.044, p=0.048). Metformin uygulaması ile D-gal uygulanan gruba göre her iki gen ifadesinde de istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmemiştir. (Şekil 4.12-B-C, Tablo 4.5).

**Tablo 4.5.** Astrosit hücrelerinde D-gal veya metforminin kombine uygulanması sonrasında senesens ile ilgili genler olan p53, p21 ve p16'nın nispi mRNA ifadelerinin aritmetik ortalama ± SS değerleri ile kontrol grubuna göre *p* değerleri verilmiştir (n=3). Satırlardaki aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği ifade etmektedir.

| **Genler** | **Gruplar** Nispi mRNA ifadeleri aritmetik ortalama ± SS (*p* değerleri) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Kontrol** | **D-gal** | **Met 0.75 + D-gal** | **Met 7.5 + D-gal** | **Met 75 + D-gal** |
| p53 | 1.00 ± 0.00 [a] | 2.09 ± 2.83 *(p=1.000)* [a] | 2.01 ± 1.76 *(p=0.996)* [a] | 1.91 ± 1.09 *(p=0.965)* [a] | 1.77±1.72 *(p=0.999)* [a] |
| p21 | 1.00 ± 0.00 [a] | 3.39 ± 0.28 *(p=0.044)* [b] | 3.36 ± 1.89 *(p=0.833)* [a,b] | 4.27 ± 2.12 *(p=0.708)* [a, b] | 0.64 ± 0.76 *(p=0.999)* [a,b] |
| p16 | 1.00 ± 0.00 [a] | 2.62 ± 0.55 *(p=0.048)* [b] | 1.51 ± 0.64 *(p=0.835)* [a,b] | 1.21 ± 0.83 *(p=0.992)* [a,b] | 1.06 ± 0.62 *(p=1.000)* [a,b] |




**Şekil 4.12.** Astrosit hücrelerinde D-gal ile indüklenen senesenste ilgili genlerin nisbi mRNA ifadelerinin metformin varlığında değişimi; **A**: p53, **B**: p21, **C**: p16 nisbi mRNA ifadelerinin aritmetik ortalama ± standart sapma değerleri verilmiştir (n=3). * kontrol grubuna göre, # ise D-gal grubuna göre anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p<0.05$).

# 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda yeni doğan şıçanların beyinlerini izole ederek astrosit hücrelerini kültür ortamında çoğaltıp karakterize ettikten sonra bu hücrelerde senesens oluşturmak için $H_2O_2$ ve D-gal uygulamaları yaptık. Senesensi indüklerken ortamda metformin varlığında ROS, DNA çift zincir kırığı ve senesens belirteçleri olan proteinlere ait genlerin ekspresyonlarının nasıl değiştiğini moleküler yöntemler ile araştırdık. Çalışmamzıda metformin $H_2O_2$ tarafından indüklenen sensenste etkili olurken, D-gal tarafından indüklenen senesenste etkili olmamıştır.

Astrosit hücreleri çeşitli tipteki oksidatif strese karşı oldukça hassas hücrelerdir. Yapılan postmortem bir çalışmada AH hastalarının frontal kortekslerindeki astrosit hücrelerinde p16 ekspresyonunun aynı yaşlardaki sağlıklı bireylere kıyasla artmış olduğu gösterilmiştir (Bhat ve ark., 2012).

Metformin T2DM hastalarında kan şekerini düşürmek için günlük 1-2 gram dozunda oldukça güvenli bir şekilde kullanılmaktadır. Bu doz ile hastalardaki plazma metformin konsantrasyonunun 50 - 100 μM olduğu bildirilmiştir (Lamoia ve Shulman, 2020). Metformin suda çözünen bir molekül olmakla birlikte yapılan klinik ve hayvan çalışmalarında beyine geçebildiği gösterilmiştir (Koenig ve ark., 2017; Suchy ve ark., 2010). Diyabetik olmayan hafif kognitif bozukluğu bulunan gönüllülere 8 hafta boyunca metformin uygulanması ile plasebo uygulananlara kıyasla öğrenme, hafıza ve dikkat artışının önemli olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada gönüllülerin serebrospinal sıvılarında metforminin kararlı durum konsantrasyonunun ortalama 96.5 ng/ml (=0.748 μM) olduğu tespit edilmiştir (Koenig ve ark., 2017). Sıçanlarda yapılan çalışmada ise metformin tek doz olarak 150 mg/kg oral yoldan uygulandıktan 6 saat sonra beyinde en yüksek konsantrasyona ulaştığı, bu durumda beyin-plazma oranının 0.99 olduğu ve serebrospinal sıvıdaki düzeyinin ise 36.6 μM olduğu bildirilmiştir. Lipopolisakkarit uygulanması ile infalamasyonun indüklendiği durumda bu düzeylerin çok daha fazla olduğu bildirilmiştir (Suchy ve ark., 2010). Metforminin yüksek konsantrasyonda (2 mM) primer kültür astrosit hücrelerinde oksijen tüketim hızını, ATP üretimini ve hücre

canlılığını belirgin şekilde azalttığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2019). Bu nedenle çalışmamızda mM düzeylerine çıkmadan klinikte metformin uygulaması ile elde edilebilecek konsantrasyonlar ile araştırma yapmayı amaçladık. Bu nedenle çalışmamızda metformini beyinde ulaşabileceği konsantrasyonlar olan 0.75 ve 7.5 µM ile plazma konsantrasyonu olan 75 µM konsantrasyonlarında uygulayarak, 2 farklı ajan ile indüklenen astrosit hücrelerindeki senesensi nasıl etkilediğini araştırdık.

Metformin oldukça yaygın olarak kullanılan oral antidiyabetik bir ilaçtır. Metformin AMPK aktivasyonu ile glikolizi uyararak, mitokondrial solunum zinciri kompleks I'i ve mitokondrial gliserol fosfatı inhibe ederek hücrelerde metabolizmayı güçlü bir şekilde etkiler. Beyinde en fazla bulunan hücreler olan astrositler beyindeki kapillerlerde bol miktarda bulunmalarından dolayı kan-beyin engelini geçen maddelere fazlaca maruz kalırlar. Mevcut çalışmalar metforminin nörodejeneratif hastalıklarla ilgili modellerde faydalı olabileceğini göstermektedir (Hsu ve ark., 2011). Tanbek yaptığı çalışmada streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde metforminin diyabetik nöropati ve bilişşel fonksiyonlar üzerine etkisine bakarak metforminin beyin dokusunda nöroprotektif etkisinin olduğunu ve diyabetle oluşan nöron hasarını düşürdüğünü gözlemlemiştir. Ayrıca metforminin diyabetin oluşturduğu oksidatif strese bağlı olarak gelişen β hücre disfonksiyonunu azalttığı da gözlemlemiştir (Tanbek, 2015).

Hücresel yaşlanma, oksidatif stres dahil çeşitli stres faktörleri tarafından indüklenebilir. $H_2O_2$ oksidatif strese bağlı erken yaşlanmayı kısa sürede elde etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Literatürdeki birçok çalışmada $H_2O_2$'nin oksidatif strese sebep olduğu ve senesens oluşturmak için kullanıldığı görülmüştür (Bi ve ark., 2008; Wang, ve ark., 2013). Çalışmamızda astrosit hücrelerinde oluşan ROS miktarına bakıldığında $H_2O_2$ uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu gözlemlenmiştir. $H_2O_2$'nin neden olduğu ROS miktarındaki artışın metformin varlığında anlamlı şekilde azalmış olması da metforminin antioksidan etkisini göstermektedir. D-gal, sıçanlarda prefrontal korteks ve hipokampustaki proteinlerin lipid peroksidasyonunu ve oksidatif hasarı arttırarak alışma ve hafıza bozukluğuna sebep olmuştur (Garcez ve ark., 2020).

Yaşlanan hücrelerin belirteçlerinden biri de hücre döngüsünü durdurmasıdır. Bu hücre döngüsü p53/p21 ve p16 /Rb tümör baskılayıcı yolakların aktivasyonu ile kontrol edilmektedir (Herranz ve Gil, 2018). İnsan ve kemirgen astrositlerinde stres kaynaklı yaşlanma ile ilgili çalışma yapan Bitto ve arkadaşları $H_2O_2$ ve proteazom inhibitörü olan

laktasistin-2 ile astrosit hücrelerine yaşlanma benzeri model kazandırmışlardır. Hücrelerin bu indüklemelerden sonra SA-β-gal eksprese ettiğini ve bunlara ek olarak yaşlanma biyobelirteci olan p21, p16 ve p53'ün artan ekspresyonlar sergilediğini eklemişlerdir (Bitto ve ark., 2010). Strese bağı DNA hasarı sonucu erken yaşlanan hücreler p53 ve p21'in nükleer ekspresyonunu artırırken, geç yaşlanmayı en iyi p16'nın yüksek ekspresyonu ifade etmektedir. Ayrıca yaşlanan hücreler lizozomal sindirim yoluyla oluşan, histolojik olarak görüntülenebilen veya Sudan Black B gibi histokimyasal boyalar kullanılarak boyanabilen siyah lipid içeren bir kalıntı olan lipofussin de biriktirmektedir (Beck ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda da literatürde bulunan sonuçlar ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. $H_2O_2$ ile senesens indüklenen grubumuzda kontrol grubuna göre p53 ve p21 gen ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Metformin uygulanması ise $H_2O_2$ uygulaması ile artan bu gen ekspresyonlarını anlamlı şekilde azaltmıştır. $H_2O_2$ uygulanması astrositlerde ROS düzeyini artırırken metformin uygulanan gruplarda $H_2O_2$'nin hücrede oluşturduğu oksidatif stresi azaltma yönünde etki göstermiştir. D-gal ile hücre senesensi indüklenen grubumuzda istatiksel olarak p53 gen ekspresyonunda anlamlı bir farklılık oluşmaz iken p21 ve p16 gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar oluşturmuştur. Metformin uygulanması D-gal'in etkisinde önemli değişiklik meydana getirmemiştir. Yapılan bir çalışmada D-gal uygulanmasının astrosit hücrelerinde senesensi indüklediği, oksidatif strese neden olduğu ve senesens ile ilşkili inflamatuar salgı artışını sağladığı bildirilmiştir (Hou ve ark., 2019). Oysaki bizim çalışmamızda D-gal astrosit hücrelerinde ROS düzeyinde anlamlı bir artışa neden olmamıştır. İki çalışma arasında D-gal'in uygulanma sayısı ve konsantrasyonu açısından farklılıklar vardır. Hou ve arkadaşları D-gal'i 50 g/l konsantrasyonda her 72 satte bir kez, 10 gün boyunca uyguladıklarını belirtmişlerdir. Bizim çalımamızda ise D-gal 40 g/l olarak 72 saatte bir uygulama olmak üzere 2 kez bu şekilde uygulanma yapılmış ve 10. günde sonlandırlmıştır. Diğer taraftan çalışmamızda D-gal ile oluşan DNA çift sarmal kırığı göstregesi olan histon H2A.X'in fosforilasyonunu grüntüleyerek belirlediğimiz hücre başına düşen odak sayısı artmış, metformin ise bu etkisini geri çevirmede ve D-gal tarafından indüklenen senesensi engellemede etkisiz olmuştur.

Myung ve arkadaşları Alzheimer hastalığında DNA hasarının kanıtı olan astrositlerde histon H2A.X'in fosforilasyonunu araştırmak için çalışma yapmışlardır. İmmünositokimyasal olarak yaptıkları çalışmada Alzheimer hastalarında hipokampal

bölgelerde ve serebral kortekste bulunan astrositlerde önemli ölçüde artan γH2AX seviyeleri bulmuşlardır (Myung ve ark., 2008). DNA çift sarmal ipliğinin kopmasıyla oluşan hasar sonrası histon proteinlerinin fosforillenmesi ile devam eder. H2AX, nükleozomlardaki histon oktomerinin bir bileşeni olan H2A protein ailesinin bir çeşididir. Bu protein fosforillenerek γ-H2AX'e dönüşür ve DNA onarım proteinlerinin alınması ve ilgili yerlere konulması için ilk adımdır. Hücrelere iyonlaştırıcı radyasyon veya sitotoksik ajanlar ile indüklenerek hücre hasarı için bir biyobelirteç olan γ-H2AX odaklarının oluşumu gözlemlenebilir (Kuo ve Yang, 2008). Bizim çalışmamızda fosforile H2A.X immünofloresan boyamada hücre başına düşen odak miktarı sayılarak analiz yapılmıştır. $H_2O_2$ ile senesens oluşturduğumuz grupta odak miktarı kontrol grubuna göre artış göstermekle birlikte istatiksel olarak anlamlı değildir. Metformin uygulanan gruplarda ise $H_2O_2$ uygulanan gruba göre odak miktarları düşmüştür fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir. D-gal uygulaması ise kontrol grubuna göre odak miktarını istatiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır. Metformin uygulanması D-gal'in bu etksini geri çevirememiştir.

Hücre kültürü şartlarında in vitro olarak gerçekleştirilen bu çalışmada hücrelerin replikatif senesense girmesini engellemek için pasaj sayısı 9'u geçmeyen hücrelerde çalışmalarımızı gerçekleştirdik. Ancak senesens ile ilgili inflamatuar sitokin ve kemokin düzeylerini tayin etmemiş oluşumuz ve ayrıca çalışmada apoptoz ile ilişkinin olup olmadığını araştırmamış oluşumuz çalışmanın eksiklikleri arasındadır.

Sonuç olarak $H_2O_2$ ve D-gal astrosit hücrelerinde senesensi indüklemiştir. Metformin $H_2O_2$'nin neden olduğu ROS artışını ve senesensi önlemede etkili olmuştur. Ancak D-gal ile oluşan DNA çift zincir kırığı ve senesens üzerinde etki gösterememiştir. Bulgularımızın in vivo çalışmalar ile de desteklenmesi önemlidir.

# 6. KAYNAKLAR


Alimbetov D, Davis T, Brook AJC, Cox LS, Faragher RGA, Nurgozhin T, Kipling D. Suppression of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fibroblasts using small molecule inhibitors of p38 MAP kinase and MK2. Biogerontology, 2016; 17(2): 305–315.

Algire C, Moiseeva O, Deschenes-Simard X, Amrein L, Petruccelli L, Birman E, Viollet B, Ferbeyre G, Pollak MN. Metformin reduces endogenous reactive oxygen species and associated DNA damage. Cancer Prev Res, 2012; 5(4): 536–543.

Bailey CJ. Metformin: historical overview. Diabetologia. 2017; 60(9): 1566-1576.

Assefa BT, Gebre AK, Altaye BM. Reactive astrocytes as drug target in Alzheimer's disease. Biomed Res Int. 2018; 2018: 1-10.

Barzilai N, Crandall JP, Kritchevsky SB, ve Espeland MA. Cell metabolism essay metformin as a tool to target aging. Cell Metabolism, 2016; 23(6): 1060–1065.

Batandier C, Guigas B, Detaille D, El-Mir M, Fontaine E, Rigoulet M, Leverve X. M. The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2006; 38(1): 33-42.

Beck J, Horikawa I, Harris C. Cellular senescence: mechanisms, morphology and mouse models. Veterinary Pathology 2020; 57(6):747-757.

Bhat R, Crowe EP, Bitto A, Moh M, Katsetos CD, Garcia FU, Johnson FB, Trojanowski JQ, Sell C, Torres C. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. PLoS One. 2012; 7(9): e45069.

Bi J, Jiang B, Hui J, Lei C, Li X, An L. Protective effects of catalpol against $H_2O_2$-induced oxidative stress in astrocytes primary cultures. Neurosci Lett, 2008; 442: 224–227.

Bitto A, Sell C, Crowe E, Lorenzini A, Malaguti M, Hrelia S, Torres C. Stress-induced

senescence in human and rodent astrocytes. Experimental Cell Research, 2010; 316(17): 2961–2968.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. Cell, 2005; 120(4): 513–522.

Chaboub LS, ve Deneen B. Developmental Origins of Astrocyte Heterogeneity: The Final Frontier of CNS Development. Dev Neurosci, 2012; (34): 379-388.

Chiurchiù V, Orlacchio A, Maccarrone M. Is Modulation of Oxidative Stress an Answer ? The State of the Art of Redox Therapeutic Actions in Neurodegenerative Diseases. Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016; 7909380.

Cohen J, Torres C. Astrocyte senescence: Evidence and significance. Aging Cell, 2019; 18(3): 1–14.

Crowe P, Tuzer F, Gregory BD, Donahue G, Gosai SJ, Cohen J, Torres C. Changes in the transcriptome of human astrocytes accompanying oxidative stress-induced senescence. Frontiers in Aging Neuroscience, 2016; 8: 1–13.

Devi L, Alldred MJ, Ginsberg SD, Ohno M. Mechanisms underlying insulin deficiency-induced acceleration of β-amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease. PLoS ONE, 2012; 7(3): 1–8.

Duca FA, Côté CD, Rasmussen BA, Zadeh M, Rutter GA, Filippi BM, Lam TK. T. Metformin activates duodenal AMPK and a neuronal network to lower glucose production. Europe PMC Funders Group 2018; 21(5): 506–511.

Fakhoury M. Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease : Implications for Therapy. Current Neuropharmacology, 2018; 16: 508-518.

Frost GR, ve Li Y. The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer' s disease. Open Biology, 2017; 7(12): 170228.

Garcez ML, Chiengo R, Cassoma S, Mina F, Bellettini-santos T, Pereira A, Budni J. Folic acid prevents habituation memory impairment and oxidative stress in an aging model induced by D-galactose. Metabolic Brain Disease, 2021; 36: 213–224.

Goodman G. Tedavinin Farmakolojik Temeli. Davis S. N., Çev.; Akkan A.G., Çev Editörü: Süzer Ö, Ed: Brunton L.L, Lazo S.J, Parker K, Nobel Tıp Kitapevleri, 2009; 1637-1638. İstanbul.

Gordon GR, Mulligan SJ, MacVicar BA. Astrocyte control of the cerebrovasculature.

Glia. 2007; 55(12): 1214-1221.

Haigis MC. ve Yankner BA. The aging stress response. Moleculer Cell, 2010; 40(2): 333–344.

Han X, Zhang T, Liu H, Mi Y, Gou X. Astrocyte senescence and Alzheimer's disease: a review. Frontiers in Aging Neuroscience, 2020; 12: 1–13.

Hennessy E, Griffin EW, Cunningham C. Astrocytes are primed by chronic neurodegeneration to produce exaggerated chemokine and cell infiltration responses to acute stimulation with the cytokines IL-1β and TNF-α. Journal of Neuroscience, 2015; 35(22): 8411–8422.

Herranz N, Gil J, Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence Mechanisms and functions of cellular senescence. The Journal of Clinical Investtigation, 2018; 128(4): 1238–1246.

Hou J, Yun Y, Xue J, Sun M, Kim S. D-galactose induces astrocytic aging and contributes to astrocytoma progression and chemoresistance via cellular senescence. Molecular Medicine Reports, 2019; 4111–4118.

Hsu C, Wahlqvist ML, Lee M, Tsai H. Incidence of dementia is increased in type 2 diabetes and reduced by the use of sulfonylureas and metformin. Journal of Alzheimer's Disease 2011; 24: 485–493.

Hua X, Lei M, Zhang Y, Ding J, Han Q, Hu G, Xiao M. Long-term d-galactose injection combined with ovariectomy serves as a new rodent model for Alzheimer's disease. Life Sciences, 2007; 80(20): 1897–1905.

Inzucchi SE, Maggs DG, Spollett GR, Page SL, Rife FS, Walton V, Shulman GI. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. N Engl J Med. 1998; 338(13): 867-872.

Wang Z, Wei D, Xiao H. Methods of cellular senescence induction using oxidative stress. Methods in Molecular Biology, 2013; 1048(2): 135–144.

Khakh BS, Sofroniew MV, Angeles L, Angeles L. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. Nature Neuroscience, 2017; 18(7): 942–952.

Kim Y, Kim Y. L-histidine and L-carnosine exert anti-brain aging effects in D-galactose-induced aged neuronal cells. Nutr Res Pract., 2020; 14(3): 188–202.

Koenig AM, Mechanic-Hamilton D, Xie SX, Combs MF, Cappola AR, Xie L, Arnold S.E. Effects of the Insulin sensitizer metformin in Alzheimer disease. Alzheimer Disease & Associated Disorders, 2017; 31(2): 107–113.

Kritsilis M, Rizou SV, Koutsoudaki PN, Evangelou K, Gorgoulis VG, Papadopoulos D. Ageing, Cellular senescence and neurodegenerative disease. Int. J. Mol. Sci., 2018; 19: 2937.

Kuo LJ, Yang LX. γ-H2ax – A novel biomarker for DNS double-dtrand dreaks. In vivo 2008; 22: 305-310.

Lai K, Elsas LJ, Wierenga KJ. Galactose toxicity in animals. IUBMB Life, 2010; 61(11): 1063–1074.

LaMoia TE, Shulman GI. Cellular and molecular mechanisms of metformin mction. Endocr Rev. 2021; 42(1): 77-96.

Li W, Chaudhari K, Shetty R, Winters A, Gao X, Hu Z, Ge W-P, Sumien N, Forster M, Liu R, Yang S-H, Metformin alters locomotor and cognitive function and brain metabolism in normoglycemic mice. Aging and Disease, 2019; 10(5): 949-963.

Lv Z,ve Guo Y. Metformin and its bBenefits for various diseases. Frontiers in Endocrinology 2020; 191: 200.

MacIel-Barón LÁ, Moreno-Blas D, Morales-Rosales S. L, González-Puertos V.Y, López-Díazguerrero N.E, Torres C, Königsberg M. Cellular senescence, neurological function and redox state. Antioxidants and Redox Signaling, 2018; 28(18): 1704–1723. https://doi.org/10.1089/ars.2017.7112

Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: Astrocytes in neurodegenerative disease. Nature Clinical Practice Neurology, 2006; 2(12): 679–689.

Molofsk AV, Krenick R, Ullian E, Tsai HH, Deneen B, Richardson WD, Rowitch D.H. Astrocytes and disease: A neurodevelopmental perspective. Genes and Development, 2012; 26(9): 891–907.

Myung NH, Zhu X, Kruman I, Castellani R. J, Petersen R.B, Siedlak S.L, Lee H.G. Evidence of DNA damage in Alzheimer disease: Phosphorylation of histone H2AX in astrocytes. Age, 2008; 30(4): 209–215.

Rotermund C, Machetanz G, Fitzgerald JC. The therapeutic potential of metformin in neurodegenerative diseases. Front Endocrinol (Lausanne). 2018; 9: 400-404.

Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K, Haapasalo A, Hiltunen M, Soininen H. Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. European Journal of Neuroscience, 2011; 34(1): 3–11.

Salmonowicz H, Passos F. Detecting senescence : a new method for an old pigment.

Aging Cell, 2017; 16: 432–434.

Serdaroğlu KE, Gökalp HK. Sıçanlarda D-galaktoz ile uyarılmış yaşlanma modelinde kefir'in Beyin Dokusundaki Oksidatif Stres Üzerine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2018; 22: 221-228.

Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative Stress: A Key modulator in neurodegenerative diseases. Molecules, 2019; 24(8): 1583.

Skaper SD, Argentini C, ve Barbierato M. Culture of neonatal rodent microglia, astrocytes, and oligodendrocytes from cortex and spinal cord. Methods in Molecular Biology, 2012; 846: 67–77.

Śmieszek A, Stręk Z, Kornicka K, Grzesiak J, Weiss C, Marycz K. Antioxidant and anti-senescence effect of metformin on mouse olfactory ensheathing cells (mOECs) may be associated with increased brain-derived neurotrophic factor levels—an ex vivo study. International Journal of Molecular Sciences, 2017; 18(4): 1–19.

Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: Biology and pathology. Acta Neuropathologica, 2010; 119(1): 7–35.

Sreekumar PG, Hinton DR, Kannan R. The Emerging Role of Senescence in Ocular Disease. Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020; Article ID 2583601.

Srikanth V, Maczurek A, Phan T, Steele M, Westcott B, Juskiw D, Münch G. Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging, 2011; 32(5): 763–777.

Stobart JL, Anderson CM. Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. Frontiersin Cellular_Neuroscience 2013; 7: 1–21.

Suchy D, Gabryel B, Bielecka A, Liber S, Okopieñ B. Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. PR 2010; 62(5): 956-965

Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, Morishita R. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Aβ deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010; 107(15): 7036–7041.

Tanbek K. Streptozotosin ile indüklenmiş diyabetik sıçan modelinde metforminin

diyabetik nöropati ve bilişsel fonksiyonlar üzerine etkisinin araştırılması. İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2015, Malatya.

Thomas I, Gregg B. Metformin ; a review of its history and future : from lilac to longevity. Pediatric Diabetes 2017; 18: 10–16.

Turnquist C, Beck JA, Horikawa I, Obiorah IE, Muhlinen N, Von Vojtesek B, Harris C.C. Radiation-induced astrocyte senescence is rescued by Δ133p53. Neuro-Oncology, 2019; 21: 474–485.

Umbayev B, Askarova S, Almabayeva A, Saliev T, Masoud A, Bulanin D. Galactose-induced skin aging : the role of oxidative stress. Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020; Article ID 7145656.

Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of astroglia. Physiological Reviews, 2018; 98(1): 239–389.

Xu X, Shen X, Feng W, Yang D, Jin L, Wang M, Huang Z. D-galactose induces senescence of glioblastoma cells through YAP- CDK6 pathway. Agıng 2020; 12(18): 18501–18521.

**EKLER**

**Tablo Ek 1.** Çalışmada kullanılan laboratuar ekipmanı, makine ve teçhizatların listesi

| Laboratuvar Ekipmanı, Makine ve Teçhizatı | **Üretici Firma, Üretim Yeri** |
|---|---|
| - 80 °C Derin dondurucular 720 Lt | Sanyo Panasonic VIP/ Binder - Japonya |
| - 20 °C Derin dondurucular | Sanyo Biomedical Freezer - Japonya |
| Buzdolabı | Siemens - Türkiye |
| Azot tankı | MVE 500 Series- ABD |
| Çalkalayacı | Excella E24 Incubator Shaker- BAE |
| $CO_2$ inkübatörü | Sanyo Panasonic - Japonya |
| Hücre kültürü kabini Lamin Air Class II | Clean Air-ABD |
| Spektrofotometre | Multiplate Reader Promega Glomax-USA |
| Kar-Buz makinası | Scotman AF 100- ABD |
| Otoklav | ALP-Türkiye |
| Sanrifüj | Hetich 380 - Almanya |
| İnvert Microskop | Leika DMI - Almanya |
| Vorteks | VWR İnternational - ABD |
| Spin | Isolab- Almanya |
| Nanodrop | Shimadzu - Japonya |
| Thermo cycler | Biomac C1000 touch - Hollanda |
| PCR Cihazı | RocheLigthcycler 480 - İsviçre |

**Tablo Ek 2.** Kullanılan kimyasal ve diğer sarf malzemeler

| **Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler** | **Marka, Üretim Yeri** |
|---|---|
| Poly-D-Lysine | Sigma - Almanya |
| DMEM-F12 | Sigma - Almanya |
| DPBS | Capricorn Scientific - Almanya |
| Fetal Bovin Serum | Gibco -USA |
| Horse Serum | Sigma - Almanya |
| Penisilin-streptomisin | Capricorn - Almanya |
| Amfoterisin B | Gibco - ABD |
| Glutamax | Gibco - ABD |
| Tripsin-EDTA | Gibco - ABD |
| Histon H2AX antikor | Bioss - ABD |
| GFAP antikor | Bioss - ABD |
| 25 ve 75 $cm^2$'lik hücre kültür flaskları | Sartedt - Almanya |
| 96 kuyucuklu siyah plaka | Corning - ABD |
| Kapatıcı medium, dapili | İnvitrogen Termo Fisher - ABD |
| $H_2O_2$ | Merck - Almanya |
| D-galaktoz | Merck - Almanya |
| Metformin | Sigma- Almanya |
| Tripan mavisi | BI -ABD |
| MTT | Sigma- Almanya |
| DCFH-DA | Cayman Chemicals-Fransa |
| 15 ve 50 ml'lik falkon tüpler | Isolab-Almanya |
| 1.5 ve 2 ml ependorf tüpler | Isolab-Almanya |

| | |
|---|---|
| 96, 48, 12 ve 6 kuyucuklu hücre kültürü plakaları | Sartedt - Almanya |
| Mikropipet uçları | Isolab- Almanya |
| Mikropipet uçları - filtreli | Isolab- Almanya |
| Serolojik pipetler (5 ve10 ml) | Sartedt - Almanya |
| Kriyovial tüp, 2 ml | Nest- ABD |
| Formaldehit % 37 solüsyonu | Tekim- Türkiye |
| Triton X-100 | Merck- Almanya |
| Sığır serum albumini | Capricorn - Almanya |
| Goat Serum | Capricorn - Almanya |
| Trizol Reagent | Transgenbiotech-Çin |
| İzopropil alkol | Sigma- Almanya |
| Etanol | Sigma- Almanya |
| Kloroform | Merck- Almanya |
| cDNA sentez kiti | ABM - Kanada |
| 96 kuyucuklu PCR plaka, seal | Roche Diagnostics - İsviçre |
| PCR tüpleri | Axygen -ABD |
| Brigthgreen master mix | ABM- Kanada |

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)

**Tarih: 09.10.2019** **Toplantı Sayısı: 10** **Karar No:19/178**

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 09.10.2019 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

| Üye Adı/Soyadı | Ünvanı | Bölümü |
|---|---|---|
| Gültekin ATALAN | Prof. Dr. | Veteriner Fakültesi |
| Coşkun TEZ | Prof. Dr. | Fen Fakültesi |
| Vehbi GÜNEŞ | Prof. Dr. | Veteriner Fakültesi |
| Füsun Ferda ERDOĞAN | Prof. Dr. | Tıp Fakültesi |
| Yusuf KONCA | Prof. Dr. | Ziraat Fakültesi |
| Ahmet ÖZTÜRK | Prof. Dr. | Tıp Fakültesi |
| M. Betül AYCAN | Prof. Dr. | Eczacılık Fakültesi |
| Zühal HAMURCU | Doç. Dr. | Tıp Fakültesi |
| Sezer DEMİRBUĞA | Doç. Dr. | Diş Hekimliği Fakültesi |
| İbrahim KARAMAN | Doç. Dr. | Tıp Fakültesi |
| Ayşe EKEN | Doç. Dr. | Eczacılık Fakültesi |
| Zeynep CAFEROĞLU | Dr.Öğr.Üyesi | Sağlık Bilimleri Fakültesi |
| Çağrı Çağlar SİNMEZ | Dr.Öğr.Üyesi | Veteriner Fakültesi |
| Özge AL | Arş. Gör. Dr. | Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK) |
| Eray AKTUĞ | Arş. Gör. Dr. | Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜTAM |
| Gencay EKİNCİ | Arş. Gör. | Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz. |
| Ali KOÇ | Kurumla İlişkisi Olmayan Üye | Sivil Üye |
| Mehmet TAV | Dernek Üyesi (Avukat) | Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi |

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji A.D.'dan **Dr. Öğr. Üyesi Gülay SEZER** tarafından sunulan **"Astrosit Hücrelerinde İndüklenen Senesent Üzerine Metformin'in Etkisi"** başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

# ASTROSİT HÜCRELERİNDE İNDÜKLENEN SENESENS ÜZERİNE METFORMİNİN ETKİSİ

ORİJİNALLİK RAPORU

| %11 | %10 | %3 | %5 |
|---|---|---|---|
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

BİRİNCİL KAYNAKLAR

| | | |
|---|---|---|
| 1 | Submitted to Erciyes Ãniversitesi<br>Öğrenci Ödevi | %2 |
| 2 | abakus.inonu.edu.tr<br>İnternet Kaynağı | %1 |
| 3 | www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080<br>İnternet Kaynağı | %1 |
| 4 | sagens.erciyes.edu.tr<br>İnternet Kaynağı | %1 |
| 5 | www.researchgate.net<br>İnternet Kaynağı | %1 |
| 6 | Submitted to Marmara University<br>Öğrenci Ödevi | <%1 |
| 7 | acikerisim.dicle.edu.tr<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 8 | biyolojiolimpiyat.files.wordpress.com<br>İnternet Kaynağı | <%1 |
| 9 | 9lib.net<br>İnternet Kaynağı | <%1 |

# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Elif İMRAL DEMİR

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

## EĞİTİM

| DERECE | KURUM | MEZUNİYET |
|---|---|---|
| Yüksek Lisans | Erciyes Üniversitesi, Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı | 2018 - 2022 |
| Lisans | Gümüşhane Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü | 2014 - 2018 |
| Lise | Hacılar A.İ.K Anadolu Lisesi | 2010 - 2014 |