



Ankaferd Blood Stopper, *Drosophila melanogaster*'de Stres ve Yaşlanma Üzerindeki Davranışı Değiştiriyor mu?

Eda Güneş^{1*}

¹ Necmettin Erbakan Üniversitesi, Turizm Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, Konya, Türkiye

E-Posta: egunes@erbakan.edu.tr

Orcid: 0000-0001-7422-9375

Gönderim 03.05.2021; Kabul 21.06.2021

Özet: Serbest radikal teorisine göre yaşlanma ile artan hareket ve ritim bozukluklarından yola çıkılarak tasarlanan çalışmada, Ankaferd Blood Stopper'in etkisi model organizma üzerinde denenmiştir. Metabolik bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklarda model olan *Drosophila melanogaster* erkeklerinde hidrojen peroksit ile hareket aktivitesi uyarılmıştır. Sinekte kombine kullanımın ROT'lar ile uyarılan tırmanmayı azalttığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ankaferd, Meyve sineği, tırmanma, serbest radikal, cinsiyet

Ankaferd Alters Behavior on Stress and Aging in *Drosophila melanogaster*?

Received 03.05.2021; Accepted 21.06.2021

Abstract: In the study designed on the basis of movement and rhythm disorders that increase with aging according to free radical theory, the effect of Ankaferd Blood Stopper was tested on the model organism. Movement activity was stimulated by hydrogen peroxide in *Drosophila melanogaster* males, which are models for metabolic disorders and neurodegenerative diseases. It has been determined that combined use in the fly reduces the climbing induced by ROTs.

Key Words: Ankaferd, Fruit fly, climbing, free radical, gender

GİRİŞ

Yaşam beklentisinin arttığı günümüzde, yaşlanmayla birlikte oluşan bilişsel ve motor işlevlerin azalması sağlıklı yaşlanma beklentisini oluşturmuştur. Yaşlanmanın farklı teorileri olduğu düşünülürse bu teorilere karşı için insanlar yaşlanma karşıtı ürünlere yada yaşam koçları ile çalışmaya başlayarak oluşacak etkiyi minimuma indirmeyi planlamaktadırlar. Yaş artışı ile azalan yürüme yeteneği, denge problemleri, sinir sistemine bağlı işlev kayıpları yada hafıza problemleri, iletişim kurmada problemler, kaygı, ve artan zorluk gibi davranışsal değişiklikler oluşmaktadır^[1-4]. Sinir sisteminde yaşlanma ile görülen bu etkiler omurgalılar ve omurgasızlar arasında korunduğu bilinmektedir^[5]. Hareket ve biyolojik ritim yaşlanma ve oksidatif stres ile değiştiği bilinmektedir^[6-8].

Yaşam süresi 1,5-2 ay kadar olan *Drosophila*, yaşlanma çalışmasında genetik olarak uygun ve davranışsal tepkilerin belirlenebildiği hayvan modellerinden biridir^[9-13]. Hidrojen peroksit (H₂O₂), reaktif oksijen türlerinin (ROT) en kararlı ve yayılabilir olanı olduğu ve diğer birçok işlemde hücrel bir sinyal molekülü olarak işlev gördüğü gösterildiğinden, davranış düzenleyici için iyi bir adaydır^[14]. Türk patentli doğal bir ajan olan Ankaferd Blood Stopper (ABS) antioksidan malzeme olarak kullanılmaktadır^[15-17]. Bu çalışmada yaşlanmanın serbest radikal teorisinden faydalanılarak sinek hareket parametrelerini uyardığı ve günlük lokomotor ritimlerini değiştirdiği bilinen H₂O₂^[18] ile ABS ile beslenen *Drosophila melanogaster* (Meigen) erkeklerinde yaşlanma ile oluşan hareket değişikliklerini anlamak için bir modelleme oluşturulmuştur.

MATERYAL VE YÖNTEM

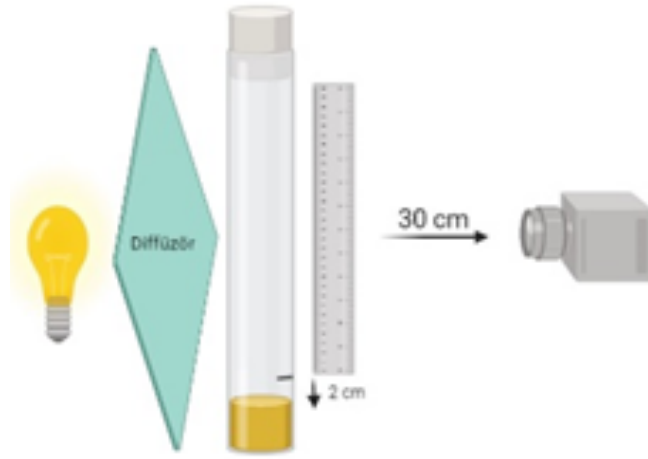
D. melanogaster (W¹¹¹⁸) kültürü, 2014 yılından beri 12/12 karanlık/aydınlık foto periyotta 25 ± 2°C ve 60–70% nemde standart kültür diyeti (SD) ile^[19] Üniversite laboratuvarında beslenmektedir. Kültür besinleri her 3-4 günde yenilenmekte ve işlemler aseptik ortamda gerçekleştirilmektedir.

Kullanılan stres modeli için %30 Hidrojen peroksit (H₂O₂) solüsyonundan %2'si kullanılmıştır^[18,20]. Ticari olarak temin edilen ABS litre başına 2 ml olarak kullanılmıştır. Gruplar: Kontrol (1), H₂O₂ (2), ABS (3) ve ABS+ H₂O₂ (4)^[26] olarak oluşturulmuştur. Önceki çalışmalar^[10, 21-25] temel alınarak

* İlgili E-posta/Corresponding E-mail: egunes@erbakan.edu.tr

deney düzeneği hazırlanmıştır (Şekil 1). İçinde 2 ml besin bulunan falkon tüpleri besin üstünden 1 cm çizilerek arkasında ışık ve difüzör bulunan masaya alınıp düzenek oluşturulmuştur. Tırmanma davranışı testi için SD ile beslenen kültürden yumurtalar toplanarak erginleşmeleri sağlanmıştır. Erginleşen aynı yaşta çiftleşmemiş erkek sinekler 1-4 numaralı besinler beslenip yaşlandırılarak (2, 48, 96 saatlik)^[18] 2 saat aç bırakıldıktan sonra soğuk anestezi altında 5'şerli gruplara ayrılmış ve yine deney gruplarının bulunduğu yeni besinlere dağıtılmıştır. Bu işlem aktifliğin fazla olduğu sabah 9 saatlerinde başlanarak yapılmıştır. Tırmanma için oluşturulan deney düzeneğine aktarılan erginler önce soğuk anestezinin elimine edilmesi için 10 sn dinlendirilmiştir. Negatif jeotaksisten faydalanarak tüpler 3 kez hızlıca masaya vurulmuş, ardından dikey mesafede hareketleri 5 sn beklenerek fotoğraflanmıştır. Bu işlem her tüp için iki kez tekrarlanmıştır. Fotoğraflanan tüpler işaret bölgelerinden 5 kadrana bölünmüş ve 5 sn sonunda tırmanma puanları hesaplanmıştır. Tüpün en üstünde kalanlar 5, en altta kalanlara ise 1 puan verilmiştir. Tırmanma performansı (TP) deney grubu başına ortalama hareket puanı/birey sayısı olarak hesaplanmıştır. Elde edilen puanlar grafik ile deney grupları için ayrı ayrı gösterilmiştir.

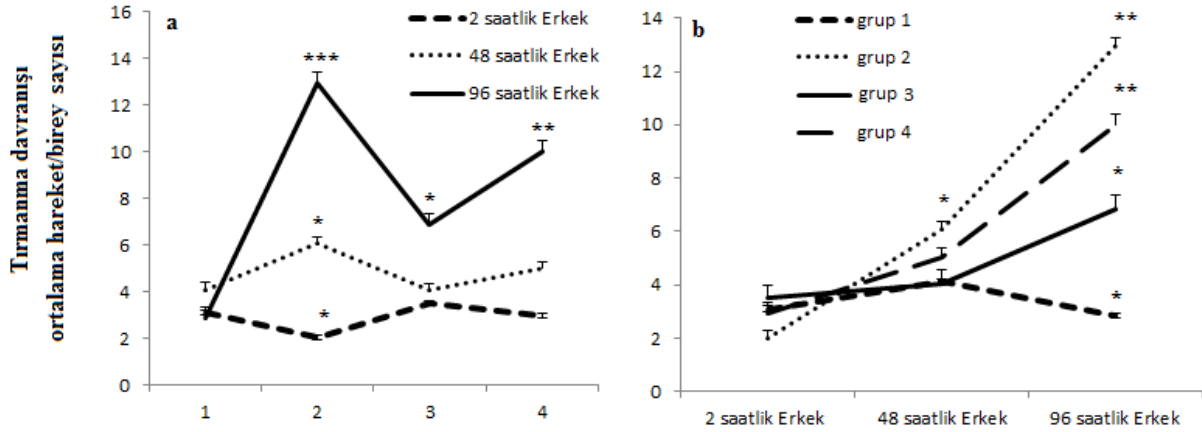
Grup içi yaşa bağlı hareket değişiminin belirlenmesinde tek yönlü "Varyans Analizi" (ANOVA), gruplar arası değişim belirlenmesinde "Kruskal-Wallis testi", ortalamalar arasındaki farkın önemini saptamak için "LSD Testi" kullanılmıştır. Standart hatalar belirtilerek ortalamaların önemi 0,05 olasılık seviyesinde değerlendirilmiştir.



Şekil 1. Tırmanma deney düzeneği

BULGULAR VE TARTIŞMA

Yön bulma, tırmanma, beslenme, ritim-uyku, öğrenme-hafıza, bağımlılık, kendini temizleme, agresyon, kur yapma gibi motor fonksiyonlar sinek davranışlarının değerlendirilerek hastalıklar ile ilişkili insan davranışlarının modellenmesinde kullanılmaktadır^[27,28]. Yaşlanmayla birlikte hareket mekanizmasının böceklerde de azaldığı ve tırmanma performansı ile ölçülebildiği bilinmektedir^[21, 29]. Benzer çalışmalarda görüldüğü gibi yaşlanmayla birlikte harekette azalma belirlenmiştir. Çalışmada tüm gruplar arasında H₂O₂ (2) ile beslenen grup yaşlanma ve artan strese rağmen en aktif hareket davranışına sahip bulunmuştur (Şekil 2b). Üç saatlik dilimde gözlem gerçekleştirilme nedeni, uygulanan 96 saatlik beslemede özellikle 2.grup bireylerin yaşama oranlarının hızla düşmesidir. Aşırı ifade edilen hareketin ömrü kısalttığı, uçuş kaslarında dejenerasyon, hareket problemleri ve oksidatif strese karşı duyarlılık ile ifade edilmektedir^[30-32]. Sürekli H₂O₂ ile beslenen sineklerin aktivitesi artarken, günlük lokomotor ritimlerin baskılanması çalışmamızla benzerlik göstermektedir^[8,18]. ABS ile beslenen 96 saatlik erkekler kontrolün 3 katı kadar aktif olsalar da, H₂O₂ +ABS uygulaması (grup 3) bireylerde tırmanma performansını daha da arttırmıştır (p<0,05; Şekil 2b). Bu uygulama ile yaşanan antioksidan enzim aktivitesinin düşmesi^[26] ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Çünkü süperoksit dismutaz enzimi (SOD) gibi antioksidan enzim yetersizliği canlılığı baskılar, hareket yeteneği hızlanırken düzensizleşir ve ölüm oranı artar^[33].



Şekil 2. Gruplar arası hareket davranış değişikliği (a), besine ve yaşa bağlı tırmanma davranışı (b). İstatistik olarak *farklıdır **'dan, ** farklıdır ***'dan ($p < 0.05$)

Negatif jeotaktik davranış, *Drosophila*'da yaşlanmanın bir göstergesidir; lokomotor performans ise oksidatif stres direnci ve hayatta kalmanın bir ölçüsü olarak kullanılabilir [34, 35]. Dişiler ve genç bireyler, erkek ve yaşlı sineklere göre daha az lokomotor bozukluk gösterir [34]. Ayrıca erkek sinekler dişilere kıyasla yaşlanma ile birlikte daha çok ROS üretir. Bu sebepten çalışmada erkek bireyler tercih edilmiştir. Tırmanma davranışı gruplar arasında kıyaslandığında ilk 2 saatlik dilimde sinekler benzer hareketlere sahip olsalar da 2 grup bireylerin daha yavaş olduğu belirlenmiştir. 48 saat sonunda ise tam tersi aynı grubun hareketi hızlanmaya başlamıştır. Fakat 96 saat sonunda en hızlı 2>4>3>1 olarak belirlenmiştir (Şekil 2a). ABS, muhtemel peroksidasyonun etkisini bir miktar düşürmüş olabilir. H_2O_2 uygulanan grubun uyku ve uyanıklık dönemlerinde düzensiz hareketlerinin olduğu ve hızlı hareket etmesi [8] çalışmamızla uyumludur. SOD'un aşırı ekspresyonu artan H_2O_2 işaret ederek lokomotor aktivitenin artmasına ve düzensizleşmesine sebep olmaktadır [36]. Dördüncü grup diyetdeki hem hidrojen peroksit hem de ABS ile; artan SOD ekspresyonu bir miktar düşürerek hareket parametrelerinde sinek aktivitesini kontrole kıyasla büyük ölçüde artırırken, 2 gruba kıyasla bir miktar düşürmüştür (Şekil 2a).

SONUÇ

Drosophila'da yaşlanmaya bağlı artan ROT çalışmaları diyet, ilaç gibi stres faktörleri ve enfeksiyon dahil olmak üzere çevresel bozulmaların davranışlara yansıdığını, bu yansımanın göstergesi olarak tırmanma davranışının belirleyici olabileceğini göstermektedir. Çalışmada ABS uygulanan sineklerin değişen tırmanma davranışı (grup 3), H_2O_2 kaynaklı oksidatif strese karşı direnç gösterdiği söylenebilir. Böylece yaşla birlikte diğer canlılarda olduğu gibi böceklerde de hareket fonksiyonları iyileştirilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Rosenzweig, E. S., Barnes, C. A., 2003, Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition, *Progress in neurobiology*, 69(3), 143-179.
- [2] Suzuki, Y., Critchley, H. D., Suckling, J., Fukuda, R., Williams, S. C., Andrew, C., Jackson, S. H., 2001, Functional magnetic resonance imaging of odor identification: the effect of aging, *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 56(12), M756-M760.
- [3] Cerf-Ducastel, B., Murphy, C., 2003, FMRI brain activation in response to odors is reduced in primary olfactory areas of elderly subjects, *Brain research*, 986(1-2), 39-53.
- [4] Prvulovic, D., Van de Ven, V., Sack, A. T., Maurer, K., Linden, D. E., 2005, Functional activation imaging in aging and dementia, *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 140(2), 97-113.
- [5] Yeoman, M. S., Faragher, R. G. A., 2001, Ageing and the nervous system: insights from studies on invertebrates, *Biogerontology*, 2(2), 85-97.
- [6] Landis, G. N., Abdueva, D., Skvortsov, D., Yang, J., Rabin, B. E., Carrick, J., Tower, J., 2004, Similar gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(20), 7663-7668.

- [7] Landis, G. N., Tower, J., 2005, Superoxide dismutase evolution and life span regulation, *Mechanisms of ageing and development*, 126(3), 365-379.
- [8] Grover, D., Yang, J., Tavaré, S., Tower, J., 2008, Simultaneous tracking of fly movement and gene expression using GFP, *BMC biotechnology*, 8(1), 1-10.
- [9] Jazwinski SM. 2000. Aging and longevity genes. *ActaBiochim Pol* 47:269–279
- [10] Feany, M. B., Bender, W. W., 2000, A *Drosophila* model of Parkinson's disease, *Nature*, 404(6776), 394-398.
- [11] Martinez, V. G., Javadi, C. S., Ngo, E., Ngo, L., Lagow, R. D., Zhang, B., 2007 Age related changes in climbing behavior and neural circuit physiology in *Drosophila*, *Developmental neurobiology*, 67(6), 778-791.
- [12] Grotewiel, M. S., Martin, I., Bhandari, P., Cook-Wiens, E., 2005, Functional senescence in *Drosophila melanogaster*, *Ageing research reviews*, 4(3), 372-397.
- [13] Martin, I., Grotewiel, M. S., 2006, Oxidative damage and age-related functional declines, *Mechanisms of ageing and development*, 127(5), 411-423.
- [14] Landis, G. N., Abdueva, D., Skvortsov, D., Yang, J., Rabin, B. E., Carrick, J., Tower, J., 2004, Similar gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(20), 7663-7668.
- [15] Goker, H., Haznedaroglu, I. C., Ercetin, S., Kirazli, S., Akman, U., Ozturk, Y., Firat, H. C., 2008, Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper®, *Journal of International Medical Research*, 36(1), 163-170.
- [16] Öner, A. F., Doğan, M., Kaya, A., Sal, E., Bektaş, M. S., Yesilmen, O., Acikgoz, M., 2010, New coagulant agent (ankaferd blood stopper) for open hemorrhages in hemophilia with inhibitor, *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 16(6), 705-707.
- [17] Satar, N. G., Cangül, I. T., Topal, A., Oktay, A., Inan, K., Akgül, M. B., 2014, Effects of Ankaferd Blood Stopper (ABS) and topical tripeptide copper complex (TCC) on wound healing in rats: An experimental study, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(4), 545-551.
- [18] Grover, D., Ford, D., Brown, C., Hoe, N., Erdem, A., Tavaré, S., Tower, J., 2009, Hydrogen peroxide stimulates activity and alters behavior in *Drosophila melanogaster*, *PloS one*, 4(10), e7580.
- [19] Güneş, E., Büyükgüzel, E., 2017, Oxidative effects of boric acid on different developmental stages of *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae), *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 41(1), 3-15.
- [20] Zhang, Z., Han, S., Wang, H., Wang, T., 2014, Lutein extends the lifespan of *Drosophila melanogaster*, *Archives of gerontology and geriatrics*, 58(1), 153-159.
- [21] Gargano, J. W., Martin, I., Bhandari, P., Grotewiel, M. S., 2005, Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*, *Experimental gerontology*, 40(5), 386-395.
- [22] Peng, C., Zuo, Y., Kwan, K. M., Liang, Y., Ma, K. Y., Chan, H. Y. E., Chen, Z. Y., 2012, Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*, *Experimental gerontology*, 47(2), 170-178.
- [23] Bartholomew, N. R., Burdett, J. M., VandenBrooks, J. M., Quinlan, M. C., Call, G. B., 2015, Impaired climbing and flight behaviour in *Drosophila melanogaster* following carbon dioxide anaesthesia, *Scientific reports*, 5(1), 1-10.
- [24] Madabattula, S. T., Strautman, J. C., Bysice, A. M., O'Sullivan, J. A., Androschuk, A., Rosenfelt, C., Bolduc, F., 2015, Quantitative analysis of climbing defects in a *Drosophila* model of neurodegenerative disorders, *Journal of visualized experiments: JoVE*, (100).
- [25] Spierer, A. N., Yoon, D., Zhu, C. T., Rand, D. M., 2021, FreeClimber: Automated quantification of climbing performance in *Drosophila*, *Journal of Experimental Biology*, 224(2).
- [26] Güneş, E., 2021, Antioxidant effects of ankaferd blood stopper doped polyvinyl pyrrolidone in an experimental model created in insect, *Food and Chemical Toxicology*, 148, 111935.
- [27] Greenspan, R. J., Dierick, H. A., 2004, Am not I a fly like thee? From genes in fruit flies to behavior in humans, *Human molecular genetics*, 13(suppl_2), R267-R273.
- [28] Zheng, Y., Xue, Y., Ren, X., Liu, M., Li, X., Jia, Y., Ji, J. Y., 2018, The lysine demethylase dKDM2 is non-essential for viability, but regulates circadian rhythms in *Drosophila*, *Frontiers in genetics*, 9, 354.

- [29] Wen, D. T., Zheng, L., Li, J. X., Lu, K., Hou, W. Q., 2019, The activation of cardiac dSir2-related pathways mediates physical exercise resistance to heart aging in old *Drosophila*, *Aging* (Albany NY), 11(17), 7274.
- [30] Pesah, Y., Pham, T., Burgess, H., Middlebrooks, B., Verstreken, P., Zhou, Y., Mardon, G., 2004, *Drosophila parkin* mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress, *Development*, 131(9), 2183-2194.
- [31] Greene, J. C., Whitworth, A. J., Kuo, I., Andrews, L. A., Feany, M. B., Pallanck, L. J., 2003, Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 4078-4083.
- [32] Hazır, C., Gamze, B., Yurter, H. E. 2021, Nörodejeneratif Hastalık Araştırmalarında *Drosophila melanogaster* Modeli, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 46(2), 237-245.
- [33] Fernandez-Ayala, D. J., Sanz, A., Vartiainen, S., Kempainen, K. K., Babusiak, M., Mustalahti, E., Jacobs, H. T., 2009, Expression of the *Ciona intestinalis* alternative oxidase (AOX) in *Drosophila* complements defects in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Cell metabolism*, 9(5), 449-460.
- [34] Deepashree, S., Niveditha, S., Shivanandappa, T., Ramesh, S. R., 2019. Oxidative stress resistance as a factor in aging: evidence from an extended longevity phenotype of *Drosophila melanogaster*, *Biogerontology*, 20(4), 497-513.
- [35] Simon, A. F., Liang, D. T., Krantz, D. E., 2006, Differential decline in behavioral performance of *Drosophila melanogaster* with age, *Mechanisms of ageing and development*, 127(7), 647-651.
- [36] Curtis, C., Landis, G. N., Folk, D., Wehr, N. B., Hoe, N., Waskar, M., , Tower, J., 2007, Transcriptional profiling of MnSOD-mediated lifespan extension in *Drosophila* reveals a species-general network of aging and metabolic genes, *Genome biology*, 8(12), 1-27.
- [37] He, Y., Jasper, H., 2014, Studying aging in *Drosophila*, *Methods*, 68(1), 129-133.