

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**RATLARDA HİPOKAMPUS VE
SUBVENTRİKÜLER ZONDA HÜCRESEL
SENESENS ÜZERİNE KURKUMİNİN ETKİSİ**

Dr.Saadet KOÇ OKUDUR

UZMANLIK TEZİ

İZMİR 2013

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**RATLARDA HİPOKAMPUS VE
SUBVENTRİKÜLER ZONDA HÜCRESEL
SENESENS ÜZERİNE KURKUMİNİN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Saadet KOÇ OKUDUR

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Mehmet Refik MAS

**Bu araştırma DEÜ Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Fon Saymanlığı
tarafından desteklenmiştir (Proje No:2012.KB.SAG.068)**

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR	I
RESİMLER	II
ŞEKİLLER	III
GRAFİKLER	IV
SİMGELER ve KISALTMALAR	V
TEŞEKKÜRLER	VII
ÖZET	1
İNGİLİZCE ÖZET	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ	3
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Hipokampusun yapısı	4
2.1.1. Hipokampus Anatomisi	4
2.1.2. İnsan Hipokampusunun Histolojik Özellikleri	4
2.1.3. Sıçan Hipokampusunun Histolojik Özellikleri	5
2.1.4. Nöroplastisite ve Nörogenez	6
2.1.5. Hipokampus Fonksiyonları	6
2.1.6. Yaşlılıkta Hipokampal Değişiklikler	7
2.2 Erişkin Nörogenez	7
2.2.1. Subventriküler Zon ve Nörogenez	9
2.2.2. Subventriküler Zon ve Yaşlılık	11
2.3 Yaşlanma ve Yaşlanma Teorileri	12
2.3.1. Yaşlanmanın Tanımı	12
2.3.2. Yaşlanma Teorileri	12
2.3.2.1. İç Etkenler (Gelişimsel-Kalıtsal Etkenler)	12
2.3.2.1.1. Uzun Yaşam Genleri Teorisi	12
2.3.2.1.2. Nöroendokrin Teori	12
2.3.2.1.3. İmmünolojik Teori	13
2.3.2.1.4. Hücrel Senesens Teorisi	13
2.3.2.1.5. Hücre Ölümü Teorisi	17
2.3.2.2. Dış Etkenler (Stokastik etkenler)	18

2.3.2.2.1. Somatik Mutasyon ve DNA Tamiri Teorisi	18
2.3.2.2.2. Ölümcül Hata Teorisi	19
2.3.2.2.3. Proteinlerin Değişikliğe Uğraması Teorisi	19
2.3.2.2.4. Serbest Radikal Teorisi	19
2.4. Antioksidan Savunma Enzimleri	21
2.4.1. Süperoksid Dismutaz	21
2.4.2. Katalaz	21
2.4.3. Glutasyon Peroksidaz	22
2.5. Kurkumin	22
2.5.1. Metabolizması	23
2.5.2. Moleküler Özellikleri	23
2.5.3. Kurkuminin Antioksidan Etkileri	24
2.5.4. Kurkuminin Diğer Biyolojik Etkileri	24
2.5.5. Güvenlik	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Deney Hayvanları ve Laboratuvar Şartları	28
3.2. Çalışma Dizaynı	28
3.3. Değerlendirmeler	31
3.3.1 Histolojik Değerlendirme	31
3.3.2 Farmakolojik Değerlendirme	35
3.3.3 İstatistiksel Değerlendirme	40
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
6. KAYNAKLAR	61

TABLÖLAR

Tablo 1: Işık mikroskopik doku takip prosedürü

Tablo 2: Cresil violet boyama prosedürü

Tablo 3: İndirekt immunhistokimyasal yöntem

Tablo 4: Analiz yöntemleri

Tablo 5: Hipokampuse ait CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerinin nöron yoğunlukları

Tablo 6: Immunhistokimyasal semikantitatif skora

Tablo 7: Ratlarda eritrosit ve beyin (sağ hemisfer) MDA, GSH-Px ve SOD enzim aktivite ölçümleri

Tablo 8: Ratlarda eritrosit ve beyin (sağ hemisfer) MDA, GSH-Px ve SOD enzim aktiviteleri

RESİMLER

- Resim 1:** Hipokampus ve isimlendirmede esinlenilen denizati ve Ammon
- Resim 2:** Sıçan hipokampusunun ışık mikroskopik görüntüsü
- Resim 3:** Curcuma longa bitkisinin kökü ve kurkuminin toz halinde görünümü
- Resim 4:** Sıçanlardan intrakardiyak kan alınması ve beyin dokusunun çıkarılması
- Resim 5:** Subventriküler zona ait ışık mikroskopik görüntüler
- Resim 6:** Hipokampuste nöron sayımının gösterilmesi
- Resim 7:** Sakrifizasyon aşamasında kurkumin grubunda gözlenen periton değişiklikleri ve kurkumin kalıntıları
- Resim 8:** Gruplara ait CA3 ve GD bölgelerinde Cresil violet boyanması
- Resim 9:** Gruplara ait subventriküler zonda CD133 immun boyanması
- Resim 10:** Gruplara ait subventriküler zonda GFAP immun boyanması
- Resim 11:** Gruplara ait subventriküler zonda Nestin immun boyanması
- Resim 12:** Gruplara ait hipokampuste beta-galaktozidaz immun boyanması
- Resim 13:** Gruplara ait subventriküler zonda beta-galaktozidaz immun boyanması

ŞEKİLLER

Şekil 1: İnsanda hipokampusun gyrus dentatus'u ve ventriculus lateralis bölümleri

Şekil 2: Ventriculus lateralis'in subventriküler zonu

Şekil 3: Subventriküler zonda prekürsor hücrelerin yerleşimi

Şekil 4: Kurkuminin kimyasal yapısı

Şekil 5: Kurkuminin biyolojik etkileri

Şekil 6: Kurkuminin senesens sürecine etkisi

Şekil 7: Çalışma dizaynı

GRAFİKLER

Grafik 1: Çalışma dizaynı

Grafik 2: 6 aylık gruplara ait CA3 ve Gyrus dentatus'ta nöron yoğunluğunun bar diyagram görünümü

Grafik 3: 12 aylık gruplara ait CA3 ve Gyrus dentatus'ta nöron yoğunluğunun bar diyagram görünümü

Grafik 4: 6 aylık gruplara ait SVZ'de immunhistokimyasal olarak CD133, Nestin ve GFAP boyanmasının bar diyagram görünümü

Grafik 5: 12 aylık gruplara ait SVZ'de immunhistokimyasal olarak CD133, Nestin ve GFAP boyanmasının bar diyagram görünümü

Grafik 6: Tüm gruplarda beyin MDA düzeyleri

SİMGELER ve KISALTMALAR

AH	: Alzheimer Hastalığı
CA	: Cornu ammonis
CAPS	: Sikloheksilamino propensülfonik asit
CUR	: Kurkumin
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EGF	: Epidermal growth factor
FGF	: Fibroblast growth factor
GABA	: γ -aminobütirik asit
GD	: Gyrus dentatus
GFAP	: Glial fibriler asidik protein
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksid
HSA	: Isı stabil antijen
IGF-I	: İnsülin like growth faktör
IHK	: Immunhistokimya
I.N.T.	: Iodonitrotetrazolium
IP	: Intraperitoneal
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
KAT	: Katalaz
MAP-2	: Mikrotübül bağlantılı protein-2
MDA	: Malondialdehit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NCAM-1	: Nöronal hücre adezyon molekülü-1
NF-Kβ	: Nükleer faktör- κ B

NKH	: Nöral kök hücre
NO	: Nitrik oksit
O₂^{·-}	: Superoksit anyon radikali
OH⁻	: Hidrojen peroksit
PSA	: Polisialik asit
ROS	: Reaktif oksijen ürünü
RMS	: Rostral göç akımı
SA-b-Gal	: Senesens ilişkili beta galaktozidaz
SF	: Serum fizyolojik
SGZ	: Subgranüler zon
SIPS	: Strese bağlı prematür senesens
SOD	: Superoksit dismutaz
STZ	: Streptozotosin
SVZ	: Subventriküler zon
TBA	: Tiyobarbütirik asit
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri
TCA	: Trikloroasetik asit
XD	: Ksantin dehidrogenaz
XO	: Ksantin oksidaz

TEŞEKKÜRLER

İlk olarak, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, tüm meslek eğitimim boyunca bana her konuda bilgi ve tecrübeleriyle yol gösterip örnek olan, çalışmanın planlanması, uygulanması ve sonuçlandırılmasında sonsuz destek ve emek veren, ilgi ve sevgisini daima hissettiğim tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Refik Mas'a,

Histolojik çalışmaların tamamlanması için yoğun emek ve özveri gösteren, tez çalışmasının yazımı, istatistiksel değerlendirmesi dahil her aşamasında sonsuz destek veren, manevi desteğiyle beni cesaretlendiren, sevgisini, ilgisini ve sabrını benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşım Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Serap Cilaker Mıcılı'ya,

Mesleki bilgi ve tecrübesiyle bana her zaman yol gösteren, tezin her aşamasında yardım eden, desteğini hissederek güç aldığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet Turan Işık'a,

Tezimi hazırlama aşamasında benden yardım ve ilgisini esirgemeyen, her türlü olanağı sağlayan, bilgi ve sevgisiyle yolumu aydınlatan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Nüket Göçmen Mas'a,

Histolojik çalışmaların tamamlanması ve değerlendirilmesi için gösterdiği yoğun destek ve emek için Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Bekir Uğur Ergür'e,

Farmakolojik çalışmaların tamamlanması ve değerlendirilmesi için yardımlarını esirgemeyen GATA Ecz. Bil. Mrk. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'ndan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Cemal Akay, Doç. Dr. Ecz. Onur Erdem ve Uzm. Ecz. Buğra Soykut'a,

Deney aşamasında bana destek olan, hep yanımda olduğunu hissettiğim değerli arkadaşım Dr. Muhammet Ali Kıyak'a,

Deney aşamasında yardımlarından ve bana gösterdikleri sonsuz sabırdan dolayı değerli deney hayvanları multidisiplin laboratuvarı personelleri Adem Ulu ve Yunus Karayel'e, deney sonlanım aşamasındaki yardımlarından dolayı Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'nda doktora öğrencisi Gökmen Baltacıoğlu'na,

Deney aşamasında gösterdiği ilgi ve yardımları için Öğrenme Kaynakları Merkezi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB) teknik sorumlusu Kim. Dr. Memduh Bülbül'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca değerli bilgileriyle bizlere ışık tutan, her konuda bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen başta İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Fatoş Önen olmak üzere tüm değerli hocalarıma,

Uzmanlık eğitimim boyunca güler yüzüyle bana her zaman yardımcı olan, tanıdığım için çok mutlu olduğum Gastroenteroloji Bilimdalı Sekreteri Mustafa Yarıcı'ya,

Öğrencilik ve meslek hayatım süresince sıcacık dostluklarıyla daima yanımda olan, birlikte üzülp sevindiğim yol arkadaşlarım sevgili Dr. Sinem Burcu Kocaer ve Dr. Semiha Havay'a; asistanlık hayatım boyunca yolumuzun keşiştiği, bu zamanı beraber paylaşmaktan çok mutlu olduğum çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca attığım her adımda bana destek olan, sevgilerinden güç aldığım canım annem ve ağabeyime; bu yolda hep yanımda olduğu için sevgili eşim Alper Okudur'a

Sonsuz teşekkür ediyorum...

Dr. Saadet Koç Okudur

ÖZET

RATLARDA HİPOKAMPUS VE SUBVENTRİKÜLER ZONDA HÜCRESEL SENESENS ÜZERİNE KURKUMİNİN ETKİSİ

Dr. Saadet KOÇ OKUDUR

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir
DEÜTF İç Hastalıkları A.D, 35340 İnciraltı/İzmir, saadetskoc7@hotmail.com**

Dünya nüfusunun hızla yaşlanması ve nörodejeneratif hastalıkların sıklığının artması araştırmacıları senesens üzerine yoğunlaştırmıştır. Hücresel senesens yaşlanan hücrelerde meydana gelen biyolojik ve genetik değişikliklerin bütünü ifade eder. İnsanoğlu yüzyıllardır ölümsüzlük arayışı içinde olmuş, yaşlanmayı ve ölümlü geciktirme gayretiyle araştırmalar yapmıştır. Son yıllarda bu konudaki araştırmalardan bir kısmı kurkumin (CUR) üzerine yoğunlaşmıştır. CUR güçlü antioksidan ve nöroprotektif özellikleri olan bir moleküldür. Çalışmamız, CUR tedavisinin hipokampal ve subventriküler zondaki hücrelerin senesense gidişi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla planlanmıştır.

Çalışmaya alınan 48 adet Wistar türü erkek sıçan üç gruba ayrıldı. Gruplar 6 ve 12 aylık sıçan içeren iki alt gruba ayrıldı. Grup 1'e 300 mg/kg CUR, Grup 2'ye çözücü madde, Grup 3'e serum fizyolojik intraperitoneal olarak günde tek doz 6 hafta uygulandı. Deney sonu ratlar eter anestezisi altında sakrifiye edilerek kan örnekleri alındı, beyin dokuları tam olarak çıkarıldı. Her ratın beyin dokusu immunhistokimyasal boyamalarla ışık mikroskop altında değerlendirildi. Alınan kan ve beyin örneklerinde superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi ile malondialdehit (MDA) seviyesi analiz edildi.

CUR verilen gruplarda (Grup 1A-B) hipokampal nöron yoğunluğunda ve subventriküler zonda (SVZ) nöral kök hücrelerde (NKH) anlamlı artış gösterdiği ($p<0,05$) ve beyin MDA seviyelerinin anlamlı şekilde düşüş gösterdiği ($p<0,05$) ortaya kondu. CUR verilen 12 aylık deneklerde (Grup 1B) aynı yaştaki diğer gruplara (Grup 2B-3B) göre SVZ'de senesens hücrelerinde anlamlı azalma olduğu saptandı ($p<0,05$).

Sonuç olarak CUR tedavisinin yaşlılık sürecinde beyin MDA seviyelerini azaltarak hipokampal nöronların senesense gidişini yavaşlatma ve SVZ'de NKH senesensini yavaşlatarak NKH sayısını artırma konusunda etkili olabileceği gösterilmiştir. Bu veriler ışığında CUR, ilerleyen yaşla ortaya çıkan kognitif yaşlanma ve ilişkili olarak nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi için umut verici bir yaklaşım olabilir.

Anahtar Sözcükler: hipokampus, hücresel senesens, hücresel yaşlanma, kurkumin, nöral kök hücre, subventriküler zon

SUMMARY

THE EFFECT OF CURCUMIN ON CELLULAR SENESENCE IN RATS' HIPPOCAMPUS AND SUBVENTRICULAR ZONE

Saadet KOC OKUDUR M.D.

**Dokuz Eylul University School of Medicine, Department of Internal Medicine, 35340
Inciraltı/Izmir, saadetskoc7@hotmail.com**

Since the aging of the world population increased incidence of neurodegenerative diseases and dementia, researchers focused on this issue. Cellular senescence means the whole biological and genetic changes occurring in aging cells. For centuries mankind has been in search of immortality and has carried out researches effort to delay aging and death. Recently, investigations have been focused on curcumin (CUR) that has strong antioxidant and neuroprotective properties. This study was designed to investigate the effect of CUR treatment on cellular senescence of the cells in hippocampus and subventricular zone.

In the study forty-eight male Wistar rats were divided into three groups. Each group were divided into two subgroups consisting of 6 and 12 months old rats. Rats in groups 1, 2 and 3 were administered 300 mg/kg CUR, vehicle and saline respectively intraperitoneally once daily for 6 weeks. At the end of the study the rats were sacrificed under ether anesthesia, blood samples were taken and the whole brain were removed. The brain samples were evaluated histologically with immunohistochemical staining by light microscopy. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activity and malondialdehyde (MDA) levels from the blood and brain samples were analyzed.

In CUR-treated groups (Group 1A-B) hippocampal neuronal density and neural stem cells (NSC) in subventricular zone (SVZ) increased significantly ($p < 0.05$) and MDA levels in brain had a statistically significant decrease ($p < 0.05$). In the 12-month CUR subjects' group (Group 1B) compared with other groups in the same age (Group 2B-3B), the senescent cells in SVZ reduced significantly ($p < 0.05$).

As a result, during the aging process CUR treatment might slow down the hippocampal neuronal senescence and might be effective of increasing the number of NSC by slowing down NCS' senescence in SVZ by reducing brain MDA levels. Based on these data, CUR might be a promising agent for preventing cognitive aging and associated neurodegenerative diseases that emerging with advanced age.

Keywords: hippocampus, cellular senescence, cellular aging, curcumin, neural stem cell, subventricular zone

GİRİŞ VE AMAÇ

Yaşlılık, insan yaşamının geri dönüşümsüz bir süreci olarak kabul edilmektedir. İnsan ömrünü uzatmayı hedef almış çalışmalar ve ileri sürülen teoriler, yaşlanmanın sadece biyolojik bir süreç değil, psikolojik, kültürel, çevresel ve ekonomik etmenlerin birlikte hazırladığı bir sonuç olduğunu ortaya koymaktadır (1, 2). Yaşlanma genel olarak spesifik bir disfonksiyon olmaksızın bir zaman periyodu olarak tanımlanırken, senesens ise ilerleyen yaşla birlikte geçmişte elde edilen yeteneklerin kaybı olarak tanımlanmaktadır (3). Senesensdeki yaşa bağlı değişikliklerden özellikle beyin etkilenmektedir (4).

Yirminci yüzyılda, bilim ve teknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak dünya nüfustaki artış hızlanmış, 1900 yılında 1,6 milyar olan dünya nüfusu, 1950’de 2,5 milyara ulaşmıştır. Birleşmiş Milletler’in istatistiklerine göre 2050 yılında Türkiye nüfusu yaklaşık 100 milyon olacaktır (5, 6). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) dünya nüfus verileri yaşlı nüfusun son yüzyılda tüm ülkelerde artmış olduğunu, önümüzdeki yıllarda doğurganlık hızının azalacağını, doğumda beklenen yaşam süresinin 80 yıla çıkacağını, nüfus projeksiyonlarına göre yaşlı nüfus oranının daha belirgin bir artış göstereceğini bildirmektedir (1, 5).

Yaşam süresinin uzaması ile geriatrik olgulardaki ölüm sebepleri arasında ön sıralarda yer alan nörodejeneratif hastalıklar ve demans insidansı artmıştır. Yapılan çalışmalar kognitif bozuklukların mortalite ve morbiditeyi arttırmakla kalmayıp ekonomik olarak da hem aileye hem de devlet bütçesine ağır bir yük getirdiğini göstermiştir (7).

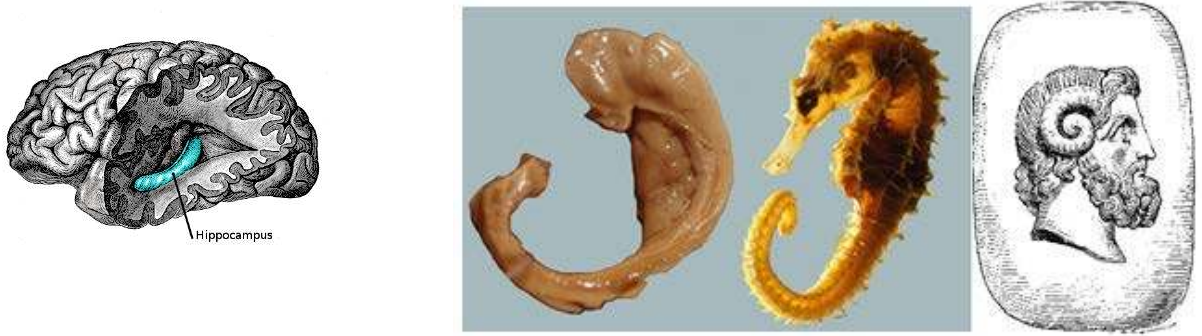
Demanstaki problemin ilerleyen yaş ile beyindeki nöron hasarı olduğu gerçeği dikkate alındığında bu nöronal hasarın yavaşlatılması ile hastalık progresyonunun azaltılabilmesi düşüncesi bütün dünya bilim adamlarında olduğu gibi bizi de bu konuda yeni arayışlara yöneltmiştir. Araştırmamız ilerleyen yaş ile beyinde meydana gelen değişimlerin yol açtığı kognitif gerilemeyle karakterize durumların önlenmesine yönelik yeni bir yaklaşım geliştirmek düşüncesiyle planlanmıştır. Çalışmamızın literatürde kurkuminin normal yaşlılık süresince beyin hücrelerinde senesense giden hücreler ile subventriküler zon nöral kök hücrelerinin senesense gidişi üzerindeki etkinliğini değerlendiren ilk çalışmalardan biri olması da ayrıca özellik arzemektedir

GENEL BİLGİLER

2.1. HİPOKAMPUSUN YAPISI

2.1.1. Hipokampus Anatomisi

Hipokampusun beyindeki yerleşimi temporal lobun derinlerinde (Resim 1), lateral ventrikül ile bazal ganglionun komşuluğundadır. Hipokampus koronal kesitlerinde denizatına benzemesi nedeni ile, 1500’lü yılların sonuna doğru anatomist Arantius tarafından Latince bu anlama gelen ‘Hippocampus’ (hippos=at, kampos =deniz canavarı) olarak adlandırılmıştır. Bundan iki yüzyıl sonra Mısırlı anatomistler tarafından ‘Ammon’s horn’ ya da ‘Cornu Ammonis’ olarak tekrar isimlendirme yapılmıştır (8) (Resim 1).



Resim 1: Hipokampus (9, 10) ve isimlendirmede esinlenilen denizatı ve Ammon

2.1.2. İnsan Hipokampusunun Histolojik Özellikleri

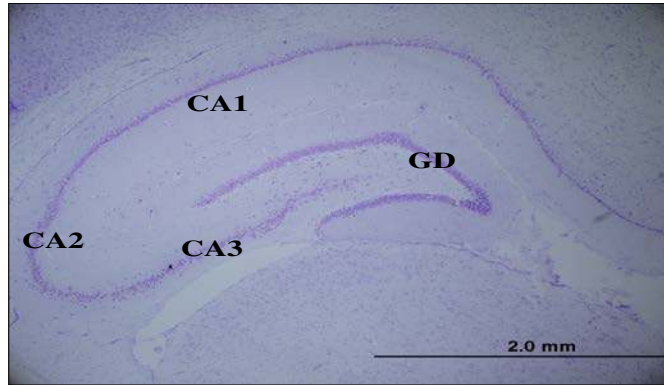
Hipokampus; prefrontal korteks, septum amigdala, hipotalamusun paraventriküler çekirdeği, gyrus cinguli gibi yapılarla limbik halkayı oluşturur. Histolojik olarak hipokampus üç bölüme ayrılmaktadır ve bu üç bölümün tamamına hipokampal formasyon adı verilmektedir. İlk bölüm cornu ammonis - esas hipokampus (hippocampus proper) diğer bölümler ise gyrus dentatus ve subikulumdur. Cornu ammonis (CA) ve gyrus dentatus fonksiyonel bakımdan en önemli bölgeleridir. Cornu ammonis içerdiği hücre farklılıklarından dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört alt bölgeye ayrılır. Bu adlandırma ilk defa 1934 yılında Lorente de No tarafından yapılmıştır (11). Bu alanlardan subikuluma en yakın olanı CA1, gyrus dentatus’a en yakın olanı ise CA3’tür. Gyrus dentatus’un bir parçası veya hilusu olarak adlandırılan CA4 alanı ise, CA3 alanı ile gyrus dentatus arasında bulunmaktadır. Fakat bu alan, içerdiği hücre yapısı ve bağlantı lifleri açısından CA3’ten farklı olmadığı için

modern sınıflamadan çıkarılmıştır (12, 13). CA3 alanında bulunan hücrelerin en önemli özelliği, gyrus dentatus'un granüler hücrelerinden gelen mossy liflerini almasıdır. Buradaki piramidal hücrelerin boyutu diğer alanlardaki hücrelere göre daha fazladır. Piramidal hücrelerin en yoğun olduğu alan ise CA2 alanıdır ve bu alanda mossy liflerinin kaybolduğu görülür. Supramamillar bölge ve hipotalamustan CA2 alanına yoğun lifler gelir (13, 14). Hipokampusun en karmaşık bölgesi CA1 alanıdır. Büyüklükleri birbirinden farklı piramidal hücrelerin bulunduğu bu alandaki nöronların %10'unu internöronlar oluşturur. Hipokampusta piramidal hücreler tüm cornu ammonis boyunca yayılmışken, granüler hücreler daha çok gyrus dentatus'ta lokalize olmuştur (15).

İnsan hipokampusu, primat hipokampusu ve sıçan hipokampusu nöronal organizasyon ve fonksiyonları açısından benzerlik gösterebilir morfolojik olarak aralarında bazı farklılıklar bulunmaktadır. İnsan ve primat hipokampal formasyonları serebral korteksin baskısıyla temporal lob içine gömülü, lineer ve transvers bir pozisyona sahipken, sıçanlardaki hipokampal formasyon orta hatta yakın çekirdeklerden başlayıp talamusun üzerinden temporal loba kadar uzanmakta ve C şeklinde vertikal bir duruş sergilemektedir (16).

2.1.3. Sıçan Hipokampusunun Histolojik Özellikleri

Sıçan hipokampusunda esas olarak granül ve piramidal hücreler bulunur (17). Sıçanlarda, hipokampal piramidal hücrelerin çoğu prenatal dönemde ortaya çıkar ve postnatal birinci ayda hipokampus tam anlamıyla fonksiyonel haldedir (18, 19). Sıçanlar da dahil olmak üzere memeli hipokampusunun subiculum, gyrus dentatus ve entorinal korteks'den meydana geldiği tanımlanmıştır (20-22). Sıçanlarda da hipokampus CA1, CA2, CA3 ve GD olmak üzere dört ayrı bölgeye ayrılmıştır (23) (Resim 2).



Resim 2: Sıçan hipokampusunun ışık mikroskopik görüntüsü (Cresil violet x4 büyütme), CA: Cornu Ammonis, GD: Gyrus Dentatus (Araştırma deneklerinden alınan beyin dokusu görüntüsüdür.)

2.1.4. Nöroplastisite ve Nöroenez

Hipokampusun fonksiyonlarına geçmeden önce kısaca bu fonksiyonlarda oldukça etkili olan nöroplastisite teriminden söz etmek uygun olacaktır. İnsanda nöronların büyük çoğunluğu prenatal yaşamda ikinci trimesterin sonunda oluşur. Nöronal migrasyon gebeliğin ilk haftalarında başlar ve doğum sırasında büyük ölçüde tamamlanır. İnsan beyninin gelişimi doğum öncesi dönem ile ilk altı yaş dolayında oldukça hızlıdır. İlerleyen yaşlarda sinaps sayısında azalma gözlenir. Ancak önceki bilgilerin tersine günümüzde nöronların kendini yenileme veya onarma yeteneği ile yeni nöronların oluşması olarak tanımlanabilecek **nöroenezisin** erişkin dönemde de devam ettiği bilinmektedir. Nöroenezle ilişkili önemli beyin bölgeleri **hipokampus** ve **bulbus olfactorius**'dur (24, 25).

Merkezi sinir sistemi gerek iç çevreden gerekse dış çevreden gelen uyarılara yanıt verme ve uyum sağlayabilme yeteneğine sahiptir. **Nöroplastisite**, iç ve dış uyarılara bağlı olarak nöronların ve oluşturdukları sinapsların yapısal özellikleri ve işlevlerindeki değişiklikler olarak tanımlanabilir. Nöroplastisite ile gerçekleşen değişikliklere örnek olarak; dendritlerde dallanmanın azalması veya artması, dendritlerde kırılma, dendrit boylarında uzama, yeni sinaps oluşumu veya mevcut sinapsların ortadan kalkması, sinapsların etkinliğinin değişmesi, nöroenezis, nörotrofik faktörlerin etkinliğinde değişimler sayılabilir (26).

Hipokampus nöroplastisite açısından en önemli beyin bölgesidir. Kortikal ve subkortikal bölgelere giden ve bu bölgelerden gelen yollar oldukça yoğundur. Hipokampusun limbik sistemin amigdala başta olmak üzere duygudurum düzenlenmesinde rol oynayan diğer bölgeleri ile sıkı bir iletişim halinde olması da nöroplastisite yönünden çok önemlidir (26).

2.1.5. Hipokampus Fonksiyonları

Hipokampus özellikle **öğrenme** ve **bellek** ile ilişkili fizyolojik olayların oluşmasında önemli bir role sahiptir. Hipokampusun amigdala, orbitofrontal korteks ve ön singulat korteksle beraber oluşturduğu sistem bilgi işleme sürecinde ve emosyonel bellek ile deklaratif bellek oluşumunda rol oynar.

Septumdan köken alarak hipokampusa projeksiyon yapan kolinerjik nöronların oluşturduğu '**septohipokampal yolak**' öğrenme ve kısa süreli bellek işlevlerinin düzenlenmesi ve yürütülmesi ile ilişkilidir. Öğrenmede ve bellekte etkin olan nöronal işlev '**Uzun Dönemli Potansiyalizasyon**'dur (LTP-Long Term Potentialization). Hipokampus aynı

zamanda neokortekste kısa süreli belleği uzun süreli belleğe dönüştürmede önemli rol oynar. Bu süreçte hipokampus uzun süreli bellek için gerekli olan ilk girdilerin sağlanması, ardından bunların uzun süreli belleğe dönüşebilmesi, uzun süreli belleğin sürdürebilmesi için gerekli olan sinaptik bağlantıların oluşturulması ve güçlendirilmesi gibi kritik bir görev yapar. Hipokampus dışarıdan gelen uyarının işlenmesi, herhangi bir tehlike içerip içermediği, eğer tehlike içeriyorsa gerekli önlemlerin alınması, eğer içermiyorsa göz ardı edilmesi gibi süreçlerde de etkin rol oynar (15).

2.1.6. Yaşlılıkta Hipokampal Değişiklikler

Yapılan birçok çalışma yaştan ilerlemesiyle beyin ağırlığının azaldığını ortaya koymuştur. Yaşla özellikle 55 yaştan sonra beyin ağırlığında %7 ile %8 oranında kayıp gelişmektedir (27). Hipokampustaki hücre kaybı ölçüldüğünde, 45-95 yaşları arasında % 27'lik lineer bir düşme olduğunu kaydedilmiştir (28).

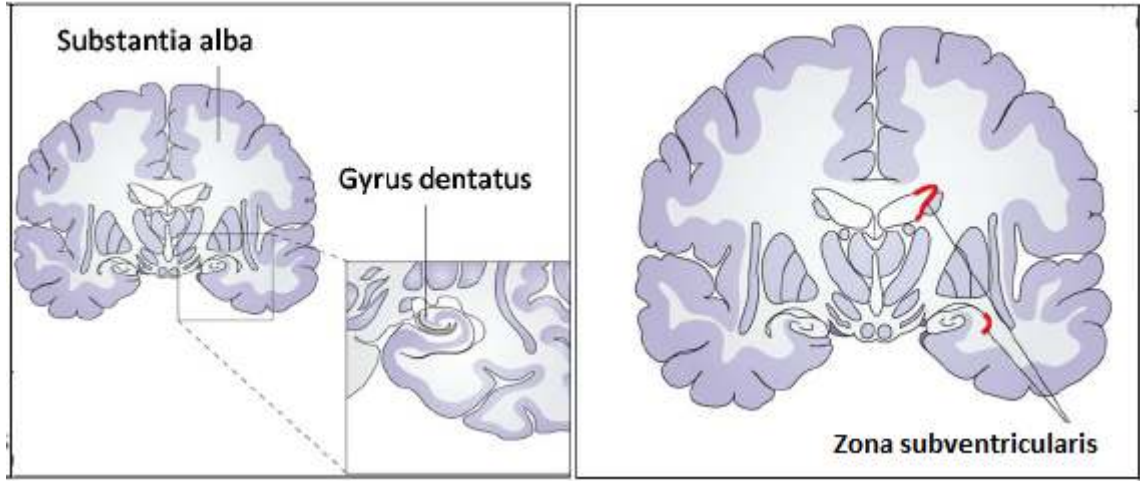
Beyin eşit oranda beyaz ve gri cevherden oluşmasına rağmen beyin ağırlığındaki azalma her iki kompartmanı eşit olarak etkilemez. 20 ila 50 yaşlar arasında beyin volümündeki kayıp gri cevherde daha belirgindir. Bundan sonra ise beyaz cevherdeki kayıplar belirginleşir. 60'lı yaşlara kadar intrakranial ve serebral volüm arasındaki oran sabit olmasına rağmen 7. dekattan itibaren bu oranın %20'lere kadar indiği görülür (29).

Yapılan hayvan çalışmalarına göre yaşlı hipokampusta nöron kayıplarının önemli bölümünün CA1 ve CA3 piramidal hücre alanlarında olduğu gözlenmiş, nöron ölümünün özellikle yaşlı Long-Evans ratlarda çoğunda ağır uzaysal öğrenme bozuklukları ile birlikte geliştiği ileri sürülmüştür (30, 31).

2.2. ERİŞKİN NÖROGENEZ

Erişkin nöroenez; fetal ve erken postnatal gelişim sona erdikten sonraki dönemde yeni nöronların oluşması ve mevcut sinir ağlarına entegre olma sürecidir. Erişkin memeli beyinde nöroenezin (yeni nöron oluşumunun) pek çok bilimsel çalışma ile yadsınamaz biçimde gösterilmesi ile sinir sisteminin tüm yaşam boyunca yapısal olarak durağan olduğu ve yeni nöron oluşumunun mümkün olmadığı yönündeki yerleşik kanı değişmiş, özellikle son on yılda sinir bilimlerinde en heyecan verici ve hızla gelişen araştırma alanlarından biri haline

gelmiştir. Çoğu memeli türünde, erişkin nörogenez iki temel beyin bölgesinde meydana gelir: Hipokampusun gyrus dentatus'u (GD) ve subventriküler zon (SVZ) (Şekil-1). Bununla birlikte, primatlarda prefrontal, inferior temporal, posterior parietal neokorteks bölümlerinde (32, 33) sıçanlarda anterior neokortekste yeni nöron oluşumunun gerçekleştiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (34).



Şekil 1: İnsanda hipokampusun gyrus dentatus'u ve zona subventricularis [Sanai ve ark.'ın (32) çalışmasından alıntılanmıştır].

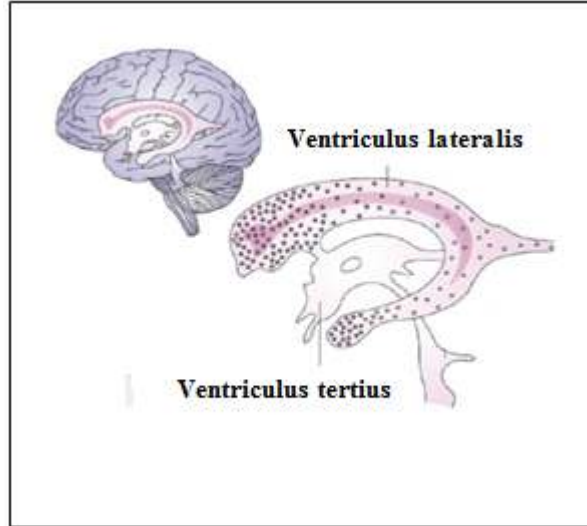
Nörogenez birbirinden bağımsız iki farklı süreçten oluşur. Birinci süreç hücre çoğalmasını kapsarken ikinci süreç ise nöronal özelliklerin kazanılmasını sağlayan farklılaşma aşaması ile genç nöronların bir bölümünün elimine olduğu, diğerlerinin ise olgunlaşmasını tamamlayarak işlevsel hale geldiği aşamaları içerir. Birbirini takip eden bu süreçlerin başlatılması ve düzenlenmesini sağlayan mekanizmalar henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Erişkin santral sinir sisteminde yeni oluşan nöronlar, glial hücre popülasyonu içindeki 'kök hücre' ve 'progenitor hücre' olarak isimlendirilen iki tip hücreden meydana gelirler. Kök hücreler farklılaşmamış, çoğalabilen, kendi kendini yenileme yeteneğine sahip, çok sayıda değişik hücre tipine farklılaşma özelliği olan hücrelerdir ve bu hücreler santral sinir sisteminde iki bölge haricinde sessiz, sakin bir durumda bulunurlar. Nöral kök hücreler CD133, GFAP (glial fibriler asidik protein) ve nestin eksprese ederler (35).

SVZ ve hippocampus'un GD bölgesinde ise nöronlar çok yavaş olarak birkaç haftada bir bölünürler. Progenitor hücreler ise çoğalma yeteneğine sahip mitotik hücrelerdir ve hızlı bölünürler. Sinir sisteminin üç ana hücre tipine (nöronlar, astrositler ve oligodendrositler) farklılanabildiklerinden multipotansiyel olarak sınıflandırılmışlardır. Her iki hücre tipi de

(kök hücreler ve progenitor hücreler) nöronal prekürsör hücreler olarak kabul edilirler (36, 37). Nöronal prekürsör hücrelerinden yeni nöron oluşumu fizyolojik nöroenezin gerçekleştiği SVZ ve GD ile sınırlı olmadığı, özellikle hasarlanma ve beyin fonksiyon bozuklukları gibi durumlarda daha belirgin olmak üzere pek çok farklı sinir sistemi bölgesinde de çoğabildiği ve nöronal ağı katılarak beynin hafıza ve öğrenme gibi fonksiyonlarına katkı sağlayabildiği de gösterilmiştir (38-40).

2.2.1. Subventriküler Zon ve Nöroenez

Subventriküler zon, lateral ventrikülün dış duvarı boyunca uzanan ve yetişkin memeli beyinlerinde yeni nöron üretiminin gerçekleştirildiği germinal bir merkez olarak kabul edilmektedir (41). Lateral ventrikülün septuma bakan iç duvarında ve korpus kallosuma komşu olan tavan kısmında SVZ'nin yer almadığı görülmektedir (42, 43) (Şekil-2).

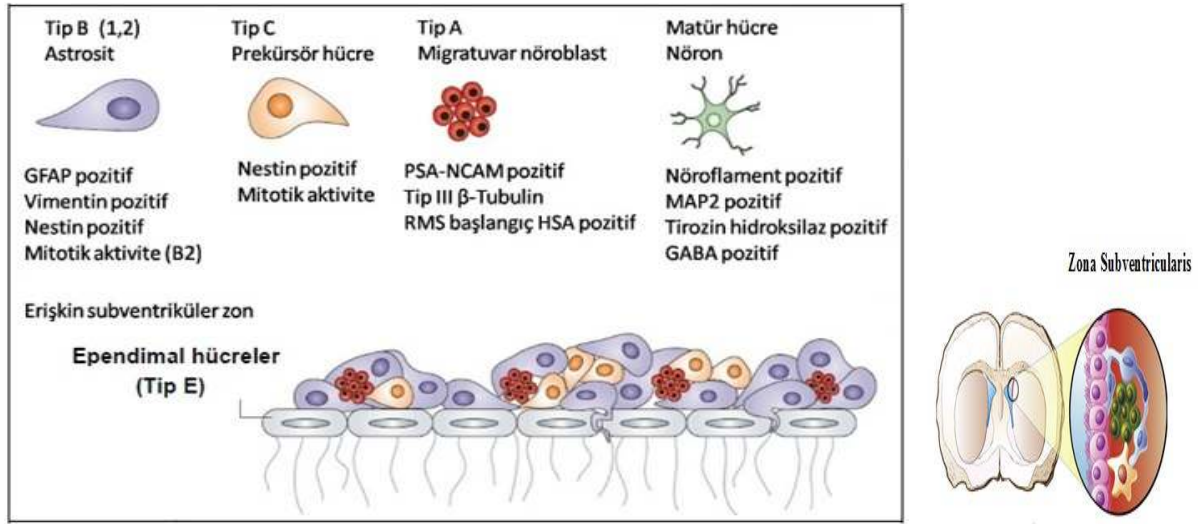


Şekil 2: Subventriküler zon (SVZ): Lateral ventriküle yerleştirilmiş siyah noktaların sayısı lateral ventrikülün o bölümünün nöroenez katkısını, kırmızı çizgiler lateral ventrikülün dış duvarında nöroenezin gerçekleştiği bölümleri göstermektedir [Vescovi AL ve ark'ın (42) çalışmasından alıntılanmıştır].

Tüm yetişkin memelilerde SVZ'de üretilen yeni nöronlar rostral yönde bulbus olfactorius'a doğru göç etmekte ve bulbus olfactorius'taki internöronların oluşumuna katkıda bulunmaktadır (44-46). Lois ve Alvarez-Buylla (44) fare beyinlerinde yaptıkları çalışmalarda SVZ'de bilateral olarak her gün 30.000 yeni hücrenin üretildiğini bildirmiştir. SVZ'de hücre çoğalması en fazla lateral ventrikülün rostralinde yer alan dorsolateral köşede gerçekleşmekte, dış duvarda kaudale doğru inildiğinde görece olarak çoğalma azalmaktadır (44). Özetle, SVZ

yetişkin beyinde progenitör hücreler açısından önemli bir depo görevi görmekte, SVZ'den izole edilen kök hücrelerin, epidermal growth factor (EGF) veya fibroblast growth factor (FGF) eklenen kültür ortamlarında çoğalabildiğini gösteren çalışmalar, bu hücrelerin çeşitli santral sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde yeni açılımlar sağlayabileceğini düşündürmektedir (47-49).

Günümüzde SVZ-bulbus olfactorius sistemi nöronal kök hücre, nörogenezis, genç nöronların göçü ve farklılaşması gibi konuların aydınlatılabilmesi açısından yoğun olarak çalışılan deneysel bir model haline gelmektedir. Subventriküler zonda moleküler, morfolojik ve ince yapısal özellikleri ile farklılıklar gösteren dört hücre tipi bulunduğu gösterilmiştir (43, 48). SVZ boyunca göç edebilen ve zincirler oluşturan nöroblastlar (tip A hücreleri), nöroblastların oluşturduğu zinciri dıştan adeta kılıf gibi saran astrositler (tip B hücreleri), nöroblastların oluşturduğu zincirin hemen bitişiğinde yer alan ve yüksek derecede çoğalabilme özelliği gösteren prekürsör hücreler (tip C hücreleri) ve matürasyonunu tamamlayan nöronlar önde gelen hücre tipleri arasında yer almaktadır (Şekil-3). Bunlara ek olarak SVZ'nin ventriküler boşluktan ayrılmasını sağlayan endotelial hücre (tip E hücresi) tabakası da bulunmaktadır (50) (Şekil-3)



Şekil 3: Subventriküler zonda prekürsör hücrelerin yerleşimi. GFAP: glial fibriler asidik protein, HSA: ısı stabil antijen, GABA: γ -aminobütirik asit, RMS: rostral göç akımı, PSA: polisialik asit, MAP-2: mikrotübül bağlantılı protein, NCAM1: nöronal hücre adezyon molekülü [Vescovi ve ark. (42) ile Alvarez-Buylla ve ark.'ın (51) çalışmalarından uyarlanmıştır].

2.2.2. Subventriküler Zon ve Yaşlılık

Yaşla ilişkili değişiklikler subventriküler zon (SVZ) ve subgranüler zon (SGZ) bölgelerinin her ikisinde de gözlenmiştir, bu durum yaşlanma sırasında nörogenezde azalmayla ilişkilidir (52, 53). Bu değişiklikler nörogenezi farklı noktalarda etkilemektedir, bu noktalar: 1) yeni hücre proliferasyonu 2) bu hücrelerin hayatta kalışı 3) bu hücrelerin hedef alana migrasyonu 4) matür fonksiyonel hücrelere farklılaşmasıdır (54).

Lateral ganliyonik eminence (55) ve yetişkin ve yaşlı SVZ’de bulunan nöral kök hücre ve progenitor hücreler embriyonik gelişim sırasında ve yetişkin yaşamı boyunca nörogenezi sağlar. Ancak, SVZ’de NKH proliferasyonunun ve nöroblast formasyonunun yaşlı hayvanlarda azaldığı gösterilmiştir (56). Yaşlanma sürecinde NKH’ler subventriküler zon mikroçevresindeki moleküler ve fizyolojik değişikliklerden etkilenmektedir (35). Nörogenezde yaşa bağlı düşüş proliferasyon ve büyüme faktör sinyallerinin azalmasına (56-58), kortikosteroid seviyelerindeki artışa (59-61) ve nöral kök hücre senesensine (62) bağlanmıştır.

Yaş ile oksidatif stresin rat hipokampusunda arttığı bilinmektedir (63). Oksidatif stres nöral ve nöroprogenitor hücre yaşam sürecinde önemli role sahiptir. Antioksidan ve antiinflamatuvar bir ajan olan kurkuminin (CUR) hücre kültüründe bifazik etki ile embriyonik nöroprogenitor hücre proliferasyonunu düzenlediği gösterilmiştir. CUR uygulamasının fare beyinde hipokampusta SGZ bölgesinde nöroprogenitor hücre artışına sebep olduğu saptanmıştır (64). Oksidatif stres oligodentrosit prekürsörlerinin ve nöroprogenitor hücrelerinin matür oligodentrosit ve nörona farklılaşmasını bozmaktadır (65, 66). Antioksidan aktivite artışı in vitro ortamda nöroprogenitor hücreleri korumakta ve in vivo ortamda nöroproteksiyon sağlayan hücresel ağ oluşumunu güçlendirmektedir (66, 67).

SVZ’de yaşa bağlı nörogenezdeki azalmanın in vivo ve in vitro senesens belirteci gen ekspresyonu artışı ve in vitro replikatif senesens artışı aracılığıyla geliştiğini düşünülmektedir, yaşlı NKH’nin senesense gidişine bağlı olarak ilerleyen yaş ile hipokampal nörogenez azalmaktadır (68).

2.3. YAŞLANMA VE YAŞLANMA TEORİLERİ

2.3.1. Yaşlanmanın Tanımı

Her canlıda görülen son derece kompleks, çok faktörlü ve evrensel bir süreç olan yaşlanma, organizmanın molekül, hücre, doku, organ ve sistemler düzeyinde, zamanın ilerlemesi ile ortaya çıkan, geriye dönüşü olmayan yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin tümü olarak tanımlanabilir (69). Canlılarda yaşlanma ilerleyici ve geri dönüşümsüzdür. Anne karnından başlayarak yaşamın sonlanmasına kadar devam eden; zamana bağlı olarak, hastalık söz konusu olmaksızın ortaya çıkan anatomik yapı ve fizyolojik işlev değişiklikleridir (70).

Yaşlanmanın temel prensip ve özelliklerini açıklamaya çalışan fizyolojik mekanizmalar genellikle teori seviyesindedir ve hiçbirisi tek başına yaşlanmayı açıklamak için yeterli değildir. Bu teoriler aşağıda olduğu gibi sıralanabilir (71, 72).

2.3.2. Yaşlanma Teorileri

Yaşlanma teorileri iç etkenler ve dış etkenler olmak üzere iki aşamada incelenebilir.

2.1.2.1. İç Etkenler (Gelişimsel-Kalıtsal Etkenler)

Yaşlanmanın kalıtsal olarak programlanmış gelişimsel mekanizmalarla kontrol edilen bölümünü oluşturur. Tek ve çift yumurta ikizleri ile yapılan çalışmalarla önemli bilgilere ulaşılmış olmasına rağmen; hala pek çok bilgiye ihtiyaç vardır (71). İç etkenler teorilerinin başlıcaları aşağıda sıralanmıştır:

- Uzun Yaşam Genleri Teorisi
- Nöroendokrin Teori
- İmmunolojik Teori
- Hücrel Senesens Teorisi
- Hücre Ölümü Teorisi

2.3.2.1.1. Uzun Yaşam Genleri Teorisi

Bu teoriye göre organizmada meydana gelen hasarlar birikime neden olmaktadır. Oluşan bu hasara karşı genetik kontrol mekanizmaları ile yanıt oluşturulmazsa; yaşlılık gerçekleşmektedir. Bu mekanizmada genetik kontrolü oluşturan genlere ‘Uzun Yaşam Genleri’ denilmektedir. Bu teoride hasar yaratabilecek oluşumlardan en önemlisi metabolik olaylardır (71).

2.3.2.1.2. Nöroendokrin teori

Yaşlanmanın sadece nöronal ve nöronlarla ilgili hormonal mekanizmalarda fonksiyonel azalmaya bağlı olarak geliştiği savunulur. Bu teorinin en önemli dayanağı;

hipotalamo-hipofizer aksın büyümenin düzenlenmesinde ve yaşlanmanın temel mekanizmalarında yer alıyor olmasıdır. Özellikle kadınlarda üretkenlik sona erince bu aksın fonksiyonlarında da hızlı bir azalma olur. Bu teori hipofizektomi yapılmış farelerde de test edilmiş ve doğrulanmıştır. Bu teoride en önemli konu; ortaya çıkan bulgulardan hangisinin patolojik, hangisinin yaşlılığa bağlı değişiklik olduğunun çözümlenmemiş olmasıdır (71).

2.3.2.1.3. İmmünolojik Teori

İmmünolojik teori iki temele dayanır;

- a) Bağışıklık sisteminin fonksiyonel kapasitesi yaşla azalır. T hücrelerinde mitojenlere cevap ve enfeksiyöz hastalıklara direnç azalır.
- b) Otoimmün hastalıklar ve otoimmün fenomen yaşla artar.

Yaşlanma ile birlikte görülen timus bezinin involusyonu ve T hücre aracılı cevabındaki kademeli azalma yaşlanma sürecinin oluşmasında etkili olabileceği düşünülmektedir (73).

2.3.2.1.4. Hücresel Senesens Teorisi

Senesens yaşlılığın karşılığı olarak; senescere'den (büyüme) köken alan kelimedir. Latince olan bu kelime olgunlaşma ile ölüm arasındaki tüm süreci ifade eder. 'Yaşlılık Bilimi' açısından ise, sadece ölümle sona eren hücresel düzeydeki büyüme kapasitesinin ifadesidir (74).

Hücresel senesens ilk kez 1961 yılında Leonard Hayflick ve Paul Moorhead tarafından tanımlanmıştır. Hayflick ve Moorhead insan embriyonundan elde ettikleri in vitro fibroblast kültürlerinde 3 faz tanımlamışlardır. Faz I' i 'primer kültür fazı' olarak tanımlamış ve bu fazda hücrelerin kültür ortamının yüzeyinde kümelenmelerini gözlemlemişlerdir. Faz II hücrelerin kültür ortamında bölünerek çoğaldıkları dönem olarak ifade edilmiş ve bu fazda hızlı bir çoğalma sürecini takiben bu sürecin sonunda hücrelerin bölünme hızında belirgin bir azalma tespit etmişlerdir. Yaklaşık olarak 50 bölünme sonunda hücrelerin mitotik aktivitelerinin durduğu, metabolik aktivitelerinin ise belirgin olarak yavaşladığı gözlemlenmiştir. Faz III olarak tanımlanan bu fazı Hayflick ve Moorhead 'Replikatif senesens' olarak isimlendirmişlerdir. Yaşlanmış olan bu hücreler metabolik olarak aktif kalır ancak çoğalamaz (75).

Ortalama 50 kez bölünme sonrası hücre bölünmesinin durmasına Hayflick limiti ya da başka bir deyişle replikatif ya da hücresel senesens adı verilir. Bu durum, fibroblastlar ve

diğer hücre serileriyle birlikte (keratinositler, endotel hücreler, lenfositler gibi) embriyonik dokulardan elde edilen hücrelerde de gösterilmiştir (75, 76).

Hücrel senesens, devamlı olarak bölünen hücrelerde, strese yanıt olarak, malign transformasyonların oluşumunu engellemek için hücre siklusunun G1 fazında durması şeklinde ortaya çıkmaktadır. Senesense uğramış hücreler (senesent hücreler) yassılaştı, genişlemiş bir morfolojiye yönelirler. Bu fenotip sonrası senesens ilişkili-beta galaktazidaz (SA-b-Gal) ve lipofuskin granüllerinde birikme şeklinde olduğu spesifik moleküler belirteçler ortaya çıkarır (77, 78).

SA-b-Gal yaygın olarak kullanılan senesens biyobelirteçlerinden biridir (79, 80). Senesent hücrelerdeki artmış SA-b-Gal aktivitesi GLB1 geni tarafından kodlanan lizozomal b-D-galaktozidazdan kaynaklanır (80). Senesent olmayan hücrelerde lizozomlarda b-galaktozidaz aktivitesi optimal pH 4'te fonksiyon gösterir (81). Senesent hücrelerde ise SA-b-Gal aktivite artışı lizozomal kompartman genişlemesine bağlıdır, optimal pH 6'da da ölçülebilen b-galaktozidaz aktivite artışına sebep olur ve bu nedenle SA-b-Gal olarak isimlendirilir (81-83). Hücrel senesens yanıtında bu enzimin gerçek yerine dair henüz herhangi bir kanıt bulunmamaktadır (81).

Hücrel senesens birçok kategoride incelenebilir, bunlardan önemli ikisi; replikatif senesens ve strese bağlı prematür senesens (SIPS). Replikatif senesens hücrenin tamamlamış olduğu bölünme sayısına bağımlıdır ve somatik hücrelerde kendiliğinden meydana gelir. Hücre bölünme sayısı genom çoğalmasının kaçınılmaz bir sonucu olarak telomer kısalması tarafından kontrol edilmektedir (84-88).

Senesens onkogen aktivasyonu, DNA hasarı, sitotoksik ilaçlar ve oksidatif stres gibi bir çok stres uyarısı ile tetiklenebilir (89-93). Senesensin bu türüne strese bağlı prematür senesens (SIPS) adı verilir. SIPS telomer durumundan bağımsızdır ancak replikatif senesens ile benzer birçok moleküler ve fonksiyonel özelliklere sahiptir. Reaktif oksijen molekülleri strese bağlı prematür senesensi tetikler, organizmanın yaşlanmasına katkıda bulunur ve yaşla ilişkili hastalıklarda rol oynar (94).

Hücrel senesens çok karmaşık bir süreç olup yalnız hücre büyümesinin durması ile ilişkili değildir. Hücrelerin genişlemesi, vakuolizasyonu, gen diziliminin baskılanması, çeşitli sinyal moleküllerinin salgılanması ve ısı şok proteinlerinin inhibisyonu da hücre yaşlanmasına etki eder (95).

Yaşla birlikte gelişen telomer kısalma fenomeni hücrelerin büyüme potansiyellerini belirleyen kurulu bir saat gibidir. Telomerler kromozomların uçlarında yer alan; degradasyon ya da diğer kromozomlarla füzyonunu engelleyen yapılardır. Hücrenin her bölünmesinde telomer dizilerinin boyunda kısalma meydana gelir, her hücre için böylece bölünme yapabileceği sayı belirlenmiştir. Yaşla birlikte telomerlerin boyu özellikle lenfositlerde kısalırken, kök hücrelerde bir değişiklik olmamaktadır (96).

Telomer kısalması primer insan hücrelerinde replikatif senesense öncülük eder. Kontrol noktaları da p53 ve Rb proteinlerine bağlıdır. P53/Rb inhibisyonu, hücreye bölünmesi için izin verir fakat daha sonra hücre 'telomer krizine' girer. Bu periyotta kromozomların yapısı bozulur ve hücre ölümü gerçekleşir. p53 kaybı nedeniyle hücre büyüklüğü kontrol edilemez. Telomer fonksiyonu aksar ve hücre mikro düzeyde bir kaosa sürüklenir. Bu aşamada hücrede meydana gelebilecek ikinci bir genetik değişiklik, hücreyi ya ölüme götürür ya da hücrel değişime yol açar. Genetik kaos, insanda birçok kanser çeşidinin gelişimindeki en önemli adımdır. Telomer krizi, replikatif senesensi başlatır. Telomeraz ekspresyonu ile replikatif senesens ya da telomer krizi atlatılır ve ölümsüzlük gerçekleşir (97).

Hücre siklusu regülasyonunda rol oynayan iki tümör supresör protein, p53 ve Rb proteini, hücrel senesensin moleküler mekanizmalarında anahtar rol oynar; bu proteinler, hücre senesens durumundayken aktive olurlar, bunların inaktivasyonu senesensi önler ve senesent hücrelerin proliferasyonu yeniden başlatmalarına izin verir. p53, p21'i aktive eder, bu durum hücre siklusu progresyonunu kontrol eden siklin bağımlı bir seri kinazın inhibisyonuna yol açar. pRB ise, hücre siklusu progresyonunda G1 faz/S faz geçişi için gerekli bir transkripsiyon faktörü olan E2F'i inhibe eder. G1 fazda geçişin durması, bilinmeyen mekanizmalar ile hücre siklusunun durması (hücrel senesens), ya da programlanmış hücre ölümüyle (apoptoz, otofaji) sonuçlanır (78, 98).

Günümüzde telomer kısalmasının yanında DNA hasarı ve oksidatif stresin de en iyi tanımlanmış senesens uyarıcılarından olduğu ortaya konmuştur. Telomer kısalması p53 yolağı üzerinden etkilidir ve hücrel senesensin en iyi bilinen, en iyi dökümanite edilmiş tetikleyicilerinden biridir. p53, hücre proliferasyonunu geçici ya da kalıcı olarak durdurur ya da apoptozise yönlendirir. Telomer kısalması, p53-p21 yolağının uyarılması senesense yol açar (97).

Bir başka önemli senesens tetikleyicisi ise oksidatif stres, senesens sinyal yollarının pek çok basamağında olaya katılır; p53 aktivasyonunda fonksiyon sahibidir. Örneğin reaktif oksijen ürünleri, DNA hasarına neden olur ve aynı zamanda telomer kısalmasını kolaylaştırır. Superoksit dismutaz inhibisyonu ise prematür senesensi indükler (78, 98, 99). Yüksek seviyelerdeki oksidatif stresin telomer boylarını kısalttığı ve senesensi tetiklediği gösterilmiştir. Hücresel senesens, replikatif senesens ya da prematür senesens farklı stresörler tarafından indüklenseler de altta yatan ortak etyoloji DNA hasarıdır. Bu nedenle biyolojik sistemlerde reaktif oksijen ürünü (ROS) oluşumunu arttıracak herhangi bir durum sonuç olarak senesensi indükleyecektir. DNA hasarı, hücresel senesens ya da apoptoza eşlik etmektedir, bu durum doku homeostazını bozmaktadır (78, 98, 100, 101).

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, bir organizmanın gelişiminin bütün evrelerinde önemli rol oynar. Yaşlanmada apoptozun rolüne ilişkin çelişkiler olsa da, yaşla ilişkili olarak apoptozun arttığı immün sistem de dahil pek çok fizyolojik sistemde gösterilmiştir. Hücresel senesens için geçerli olduğu gibi, apoptoz da hücresel strese karşı verilen bir yanıttır ve çok önemli bir tümör supresör mekanizmadır. Stres altındaki hücrenin senesense mi yoksa apoptoza mı yönleneceğini neyin belirlediği çok açık olmasa da, hücrelerin büyük bir çoğunluğu her iki sürece de kolaylıkla girebilir. Hücre tipi bu konuda önemli bir belirleyicidir. Hasarlanmış epitel hücreleri ve fibroblastlar senesense, hasarlanmış lenfositler ise apoptoza yönelirler. Apoptoz ve hücresel senesens arasında karşılıklı haberleşme şeklinde iletişim söz konusudur (77, 98, 102, 103).

Doğumda insan T-hücreleri %100 oranında CD28 eksprese eder ancak yaşlılarda bu oran %50'ye düşer. CD28 (-) hücreler, CD28 (+) hücrelerden köken aldıkları bildirilmiştir ve CD28 (-) hücrelerde telomer kısadır. CD28 T-hücre aktivasyonunda kritik bir rol oynar (IL-2, apoptoz, sitokin stabilizasyonu ve hücre adezyonu gibi). Yaşlı kişilerden elde edilen T-hücrelerde Hsp 60, 70 ve 90 olmak üzere ısı şoku proteinlerinde azalma saptanmıştır (104). Replikatif senesense giren T-hücrelerinde TNF ve IL-6 sitokinlerinde artış saptanmıştır. Hücreler, IL-2 varlığında çoğalamazlar. Bunlara bağlı olarak oksidatif stres ve viral enfeksiyona karşı cevap bozulur. Sonuç olarak, hücresel senesens, normal fonksiyonlarda azalma dışında selektif olarak genetik ve fenotipik özelliklerin ortaya çıkmasıdır (105).

Replikatif ya da hücresel senesens hücre ölümü değildir. Bu hücreler, apoptoza dirençlidir ve in vitro olarak üç yıl süresince metabolik olarak aktif olduğu bildirilmiştir.

p53'ün senesense giren hücrelerde değişime uğradığı ve senesense giren fibroblastların p53 bağımlı apoptoza giremediği ve bunun yerine DNA hasarına bağlı olarak nekroza gittikleri gösterilmiştir (106).

Oksidatif stres hücrede çok sayıda fonksiyonu etkiler. Örneğin, lipid peroksidasyon oluşunca membran permeabilitesi değişir; nükleer ve mtDNA'daki oksidatif hasarlar kontrol edilemeyen düzeyde proliferasyona ya da kolaylaşmış hücre ölümüne neden olur; oksidatif stres aracılı protein agregasyonu, yaşlanmayla ilişkili nörodejeneratif hastalıklarda saptanan nöronal ölümlerin başlıca sebebidir (99, 107-109).

Lipid peroksidasyon ürünlerinin bazıları strese duyarlı sinyal iletimi yollarının aktivasyonunda önemlidir, ayrıca oksidasyonla hasarlanmış DNA, p53 aktivasyonu aracılığıyla, hücrede apoptozu ve senesens kaskadını tetikler (77, 98).

Hücrel senesens strese karşı verilen ve bir organizmanın ömrünün uzamasına katkıda bulunan adaptif bir yanıt olarak bilinse de, bu fenomen organizmanın sağkalımında negatif bir öneme sahip olabilir (98). Senesent hücreler sitokinler, büyüme faktörleri, inflamatuvar mediatörler ve çeşitli proteazları içeren biyoaktif moleküller sekrete ederler. Bu moleküllerin sekresyonu hücre ve doku mikroçevresini yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara yol açmak üzere değişime uğratırlar (110). Doku yaşlanması senesent hücre birikimi ve sekresyonları ile kök hücre yenilenme kapasitesindeki kayıplardan kaynaklanır (111, 112).

2.3.2.1.5. Hücre Ölümü Teorisi

Nekroz inflamatuvar olayların sorumlu olduğu hücre ölümüdür. Apoptoz ise genetik kontrollü hücre ölümüdür. Apoptoz homeostazın devamı açısından gerekli gelişimsel bir olaydır. Apoptoz engellendiğinde, malign transformasyon artarken kontrolsüz olarak arttığında total fonksiyon kaybı gelişmektedir (113, 114).

2.3.2.1.5.1. Apoptotik hücre ölümü

İskoçyalı patolog Kerr tarafından, ilk defa 1972 yılında nekrozdan farklı bir hücre ölümünü anlatmak için kullanılan apoptoz terimi, fizyolojik ve patolojik olaylarda meydana gelmekle birlikte kelime olarak eski Yunanca'da 'yaprak dökümü' anlamına gelir (115). Apoptoz süreci bizzat hücrenin kendisi tarafından programlanmakla birlikte bu hücrel programlanma travmalar, lezyonlar veya genetik faktörlerle aktive edilmektedir ve hücrenin intiharı olarak özetlenebilen bir süreçtir. Hormon azalmasına bağlı olarak meydana gelen involusyonlarda ve immun reaksiyonlarda embriyonal ve fetal gelişim sürecinde, yaşlılıkta, fizyolojik olarak özel hücrelerin kaybindan apoptoz sorumludur (116).

Organizmada apoptoz oranının artması dokuda hücre sayısındaki azalmaya, apoptoz oranının azalması ise dokuda hücre sayısında artmaya yol açacağından apoptoz mekanizmaları canlıda denge unsurudur denilebilir. Apoptoz vücudun bütünündeki hücre sayısının sabit kalmasına da yardımcı olmaktadır (117). Hücresel replikasyon işlemi yani DNA onarımı apoptoz sürecinden önce durur. Apoptoz sürecine girilip girilmeyeceği hücrenin tümör geliştirme riskine, patolojinin büyüklüğüne veya hücrenin tipine göre değişir (118).

2.3.2.1.5.2. Otofajik hücre ölümü

Otofaji, hücrenin kendi komponentlerini toptan degradasyon için lizozomlara bıraktığı bir süreçtir. Bu süreç, hasarlanmış organellerin, hücre içi patojenlerin ve sitoplazmadaki gereksiz, uzun yaşamış, anormal ya da çökmüş proteinlerin eliminasyonu için başlıca turnover mekanizmasıdır. Kısa ömürlü proteinler ise tercihen proteozom yolağından elimine edilirler. Bir çok koşulda otofaji, hücreleri stres koşullarına adapte ederek hücre canlılığını teşvik eder. Bu durumda paradoks gibi görünse de otofaji hücre ölümünün nonapoptotik bir programı gibi değerlendirilebilir. Senesent ve postmitotik hücrelerde, otofaji strese adaptör bir mekanizma olarak işler. Kalori kısıtlaması halinde otofajinin indüklenmesi yaşla ilişkili hastalıkların gelişiminin azaltılması için geliştirilmiş bir strateji olarak bildirilmektedir (98, 119). Mitokondride ROS aşırı birikimi hücredeki oksidatif stresi arttırır. Sinir sisteminde oksidatif stres dopamin oksidasyonuna neden olarak otofajik hücre ölümüne yol açar (120).

2.3.2.2. Dış Etkenler (Stokastik etkenler)

Rastlantısal olarak canlı moleküllerde oluşan hataların toplamının yaşlılığın gelişimine neden olduğunu savunur. Oluşan bu hataların yarattığı hasarlar birikir ve fizyolojik aktivite azalır. Başlıcaları şu şekilde sıralanmıştır:

- Somatik Mutasyon ve DNA Tamir Teorileri
- Ölümcül Hata Teorisi
- Proteinlerin Değişikliğe Uğraması Teorisi
- Serbest radikal Teorisi

2.3.2.2.1. Somatik Mutasyon ve DNA Tamiri Teorisi

Radyasyon gibi organ düzeyinde farklılaşma (kanser, glomeruloskleroz gibi) yaratan dış etkenler, yaşlanma olmaksızın yaşam süresini kısaltır (121). DNA tamiri teorisi ise hücre kültürlerinde ultraviyole ile yaratılan DNA hasarının tamir edilebilirliği oranında yaşam süresinin belirlendiği esasına dayanır. Ancak, yaşam süresinin belirlenmesinde ortalama tamir

yeteneği ve tamir hızından çok DNA'nın özel bölgelerinin tamir yeteneğinde gelişen azalmanın daha önemli olduğu düşünölmektedir (122).

2.3.2.2.2. Ölümcöl Hata Teorisi

Hücre fonksiyonlarında yaşa bağlı olarak meydana gelen değişikliklerin protein sentezindeki hataların birikmesinden kaynaklandığı esasına dayanır. Hatalı molekül sentezi normal protein üretimi esnasında da olur ve temizlenir (123).

2.3.2.2.3. Proteinlerin Değişikliğe Uğraması Teorisi

Proteinlerde meydana gelen fonksiyonel değişiklikler enzimlerde de gerçekleşir. Bu enzimlerin spesifik fonksiyonları azalırken, ısıya yanıtları da değişir. Proteinlerin ısı değişimlerine karşı toleransları azalır (124). Özellikle enzimatik olmayan yoldan gelişen; karbonhidrat ve proteinlerin amino grupları ile etkileşimi 'İleri Glukolizasyon Son Ürünleri' ve amiloid birikimi ile sonuçlanır. Kollajen ve elastin gibi hücre dışı matriks proteinlerinde meydana gelen değişiklikler ile kovalent çapraz bağların yapısının bozulması gen ekspresyonunun bozulmasına yol açar (125).

2.3.2.2.4. Serbest Radikal Teorisi

İlk olarak yaşlılığa bağlı değişikliklerin büyük çoğunluğunun elektron yükü bulunan molekül ve atomlardan kaynaklanan ve yüksek oranda reaktif olan serbest radikallere bağlı olduğu teorisini ortaya atılmıştır (126). Bu teoride aslında hem dış etkenler hem de gelişimsel ve kalıtsal özellikler geçerlidir. Serbest radikal teorisi yaşlanmanın, yaşam süresince oluşan düşük düzeylerdeki serbest radikal hasarlarının birikmesi ile olduğunu öngörmektedir (127). Serbest radikal teorisi, yaşlanmayı yaş ile birlikte dokuda artan oksidatif hasar ve azalmış antioksidan kapasite olarak açıklar (128, 129).

Kümülatif ve potansiyel olarak artan oksidatif hasar, yaşlanma sürecinde fonksiyonel ve patolojik bozukluklara yol açar (130, 131). Aerobik hücreler tarafından kullanılan oksijenin % 90'ından fazlası mitokondri tarafından tüketilir ve mitokondriyal solunum zinciri vasıtasıyla devamlı olarak oksijen serbest radikalleri ve hidroperoksitler üretilir (131). Oluşan radikaller, lipidler, proteinler ve DNA'da oksidatif hasara neden olabilir (132). Yaşlanma ile birlikte oksidatif hasarın arttığı, hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerinin zayıfladığı kan, beyin (133), kalp (134), iskelet kası (135) ve karaciğer (136) gibi pek çok dokuda gösterilmiştir.

Süperoksid, hidroksil (OH⁻) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) radikalleri fizyolojik metabolik reaksiyonlar sırasında oluşan reaktif oksijen ürünleridir (ROS). ROS antioksidan

savunma sistemleri tarafından temizlenir. En önemli antioksidan enzimler superoksid dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) olarak bilinmektedir. Beyin KAT aktivitesi düşük seviyededir ve peroksizomlarla sınırlıdır. Bu nedenle GSH-Px sinir dokusunda daha önemlidir, görevi ise H_2O_2 artıklarını temizlemektir (137). Antioksidan enzimler ROS tarafından meydana gelen hücresel ve histolojik hasarı önleme konusunda önemli rol oynamaktadır. Antioksidan savunma ile serbest radikaller arasında serbest radikaller lehine dengesizlik oksidatif strese/hasara yol açmaktadır (55, 138).

Dengenin oksidan bölge lehine bozulması organizmadaki çok sayıdaki makromolekülde oksidatif hasara neden olur ve hasarların nispeten dengeli ve kararlı bir biçimde birikimi yaşla artar. Makromoleküllerde oksidatif hasar, çok sayıda hücresel sürecin fonksiyonel yeterliliğini bozar ve giderek fonksiyonel kayıplar meydana gelir (139). Makromoleküllerde ortaya çıkan hasarlar hücrede geri dönüşümsüz bir şekilde yığıldıklarında, mitotik hücreler replikasyondan kaçınırlar ve kalıcı olarak hücre siklusunu durdururlar (hücresel senesens) ya da hücrede ölüm programları (apoptoz) tetiklenir (69).

Beyin diğer organlara göre gram doku başına daha fazla ROS üretir (140). Yüksek metabolik aktivitesi, yüksek lipid içeriğin ve antioksidan savunma mekanizmalarının sınırlı aktivitesinden dolayı oksidatif hasara çok duyarlı bir organdır (133).

Oksidan moleküller belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyon ajanlarına karşı önemli savunma molekülleridir. Ancak belirli düzeyin üzerinde oluştuklarında veya antioksidan sistemin yetersizliğinde ROS'yi organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açar (141).

ROS'yi bütün hücresel makromoleküllerle reaksiyona girebilirler. Hücresel hasar oluşumunda özellikle üç tip reaksiyon önemlidir:

a) Lipid Peroksidasyonu: ROS, plazma ve organel membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olurlar. $OH^\cdot$ radikali membran lipidleri ile çift bağ yapar ve böylece lipid-radikal etkileşimi ile zincirleme reaksiyon sonucu pek çok lipid peroksidasyon ürünü (malondialdehit, dien konjugatları gibi) oluşur. Eritrosit membranlarının, lipozomal membranların (özellikle hücre ve mitokondri) okside olması ile bu yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri değişir. Membranın iyon geçirgenliği bozulur. Eritrositlerde hemoliz olur. Böylece yaygın membran, organel ve hücre hasarı ortaya çıkar (142, 143).

b) Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu: ROS'yi aminoasit yan zincirleri oksidasyonuna neden olarak protein-protein bağlarının oluşmasına yol açarlar. Ayrıca protein yapısında, ana zinciri okside ederek proteinlerin parçalanmasına neden olurlar. Böylece hücrede fonksiyonel önemi olan enzimlerde bozulmalar ortaya çıkar (142, 143).

c) DNA Hasarı: ROS'yi nükleer ve mitokondrial DNA'da timin ile reaksiyona girerek tek zincir kırılmaları oluşturur. Sonuçta hücrelerin enerji kaybetmeleriyle nekrotik tipte hücre ölümü olur (142, 143).

2.4. ANTİOKSİDAN SAVUNMA ENZİMLERİ

Hücrede oluşan serbest radikallerin detoksifikasyonu özellikle daha çok enzimatik mekanizmalarla gerçekleşir. Antioksidan savunmanın önemli bir kısmını superoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve H_2O_2 'yi temizleyen özel enzimler oluşturur. Bunlar SOD, KAT ve GSH-Px enzimleridir (144).

2.4.1. Süperoksid Dismutaz

Serbest radikallere karşı organizmada ilk savunma SOD enzimi ile gerçekleşir. SOD, $O_2^{\cdot-}$ radikalini metabolize eder ve daha zararlı olan $OH^{\cdot}$ radikalinin oluşumunu engeller. $O_2^{\cdot-}$ radikalini H_2O_2 'e ve moleküler oksijene dönüştürür. Tepkime, ürünü olan H_2O_2 tarafından inhibisyona uğrar (145, 146).

Enzim metalloprotein yapısındadır. Ökaryotik hücrelerde dört farklı şekli bulunmaktadır. $O_2^{\cdot-}$ molekülleri ile spontan olarak dismutasyona uğrayabilir. Sulu ortamda kendiliğinden ve hızlı bir şekilde dismutasyona uğrayarak $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 oluşturur. SOD varlığı dismutasyon hızını 10000 kat artırır. Böylece $O_2^{\cdot-}$ radikalinin potansiyel substratla reaksiyona girmesi ve $OH^{\cdot}$ gibi daha toksik ürünlerin oluşması SOD tarafından önlenir. Organizmada oksidatif stresin ve dokuda oksijen parsiyel basıncının arttığı durumlarda SOD enzim aktivitesi artmaktadır.

2.4.2. Katalaz

KAT, konsantrasyonu değişmekle birlikte tüm hücrelerde bulunan yapısında bir hemoprotein içeren enzimdir. %20 oranında sitoplazmada, %80 oranında peroksizomlarda bulunur. Tetramerik yapıda ve her bir aktif merkezde bir hem grubu içerir. H_2O_2 'nin oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda katalitik reaksiyonla iki molekül H_2O_2 'yi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır (147).

Katalaz reaksiyon sırasında bir molekül H_2O_2 'ye e^- vericisi, diğeri de elektron alıcısı olarak kullanır. H_2O_2 üretim hızı arttıkça KAT aktivitesi de artar. Böylece aşırı H_2O_2 üretimi sırasında glutatyon tükenmesi önlenmiş olur (148).

2.4.3. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon sistemi, oksidatif hasarın azaltılmasında rol oynayan, serbest radikallerin hücre içinde detoksifikasyonuna neden olan ve lipid peroksidasyonunu önleyen en önemli endojen mekanizmalardandır. İntrasellüler glutatyon olarak bulunan en güçlü tiol bileşiğidir.

GSH-Px enzimi, selenyuma bağlı sitoplazmik bir enzimdir; H_2O_2 'yi detoksifiye ederek su ve okside glutatyonla dönüştürür. GSH-Px'in antioksidan aktivitesini göstermesi, hücre içinde yeterli konsantrasyonda glutatyon redüktaz, GSH ve nikotinamid adenindinükleotid bulunmasına bağlıdır (149).

2.5. KURKUMİN

Curcuma longa, Hindistan ve Çin'de yaygın olarak bulunan Zingiberaceae ailesine ait bir bitkidir. Bu bitkinin köklerinden elde edilen turmerik Hindistan'da yüzyıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Turmerik, ilk kez 1842 yılında Vogel tarafından izole edilmiştir. Kurkuminin yapısının diferuloylmethan olduğunu 1910 yılında Lampe ve Milobedeska ortaya koymuştur.

Turmeriğin aktif maddesi olan kurkumin [(CUR) (diferuloylmethan)] portakal sarısı rengi ile gıda boyası olarak da kullanılmaktadır (150) (Resim 3). Çok iyi bilinen ve sıklıkla kullanılan köri baharatının da ana komponentidir.

CUR'nin antioksidan özelliğinin yanısıra antiinflamatuvar, immunmodülatör, antitümoral ve antipsöriyatik etkinliği gösterilmiştir (151).



Resim 3: *Curcuma longa* bitkisinin kökü ve kurkuminin toz halinde görünümü (152).

2.5.1. Metabolizması

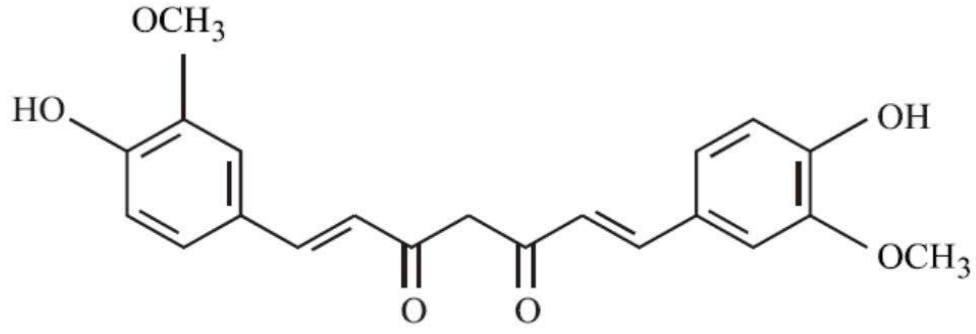
Kurkumin, suda çözünmez ve hücre membranının hidrofobik ceplerinde lokalize olur. Moleküler özellikleri nedeniyle hücrelere hızlıca penetre olmakta, plazma membranından kolayca geçerek sitozole girmektedir. Sitoplazmada biriken CUR çekirdeğe geçemez. Lipofilik özelliklerinden dolayı plazma membranı, endoplazmik retikulum ve çekirdek kılıfı gibi membranöz yapıların içinde yoğunlaşmaktadır. CUR dolaşımında çok düşük düzeyde yer almakta veya hiç bulunmamaktadır (153). CUR bağırsaklardan emilimi sırasında renksiz ve daha az polar olan tetrahidrocurcumin adlı metabolitine dönüşmektedir. Tetrahidrocurcumin bağırsaklardan emilerek tüm dokulara dağılmakta; karaciğerde glukuronlanarak, safra yolu ile atılmaktadır (154). Biyotransformasyona uğramış olan CUR'nin stabil formunun tetrahidrocurcumin olduğu ve bu formun CUR'nin biyolojik etkileri üzerinde önemli role sahip olabileceği ayrıca CUR'nin redüksiyon ve glukuronidasyon gibi mikrozomal enzimatik reaksiyonlarla metabolik aktivite gösterebileceği bulunmuştur (155).

CUR'nin farmakokinetik parametrelerini incelemek amacıyla yapılan çalışmalarda, kurkumin 1g/kg dozda sıçanlara uygulanmış ve oral absorpsiyonunun çok düşük olduğu bulunmuştur (156, 157). Ağızdan alınan CUR'nin yaklaşık %75'i feçesle, geri kalan kısmı ise idrarla atılmaktadır. Intraperitoneal uygulamalarda da vücuttan atılımı benzer olmakla birlikte, %11'i dekonjuge olarak safra ile atılmaktadır (158).

2.5.2. Moleküler Özellikleri

Kurkumin genel olarak doğal ve yapay kurkumin şeklinde sınıflandırılmaktadır. Kurkumin, demetoksikurkumin, bisdimetoksikurkumin doğal olarak bulunan bileşiklerdir (159). CUR polifenolik bir bileşiktir. Kimyasal yapısı Şekil 4'de gösterilmiştir. Keto ve enol formu bulunmaktadır. CUR pH 3-7 aralığında güçlü bir H⁺ atom donörüdür, buna karşın pH 8'in üzerinde enol form hakimdir ve bir elektron donörü gibi hareket etmektedir ki bu fenolik antioksidanların çöpçü aktivitesi için tipik bir mekanizmadır. Moleküler ağırlığı 368.37 g/mol ve erime noktası 183°C'dir. CUR suda çözünmeyen fakat aseton, dimetil sülfoksit (DMSO) ve etanolde çözünebilir bir moleküldür (160).

Yapılan araştırmalarda doğal CUR'nin kimyasal koruyucu, antioksidan ve benzeri etkilerinin kanıtlanması sonucu araştırmacılar benzer yapıda ancak farklı içerikteki sentetik CUR'ye yönelmiştir (161).



Şekil 4: Kurkuminin kimyasal yapısı (162).

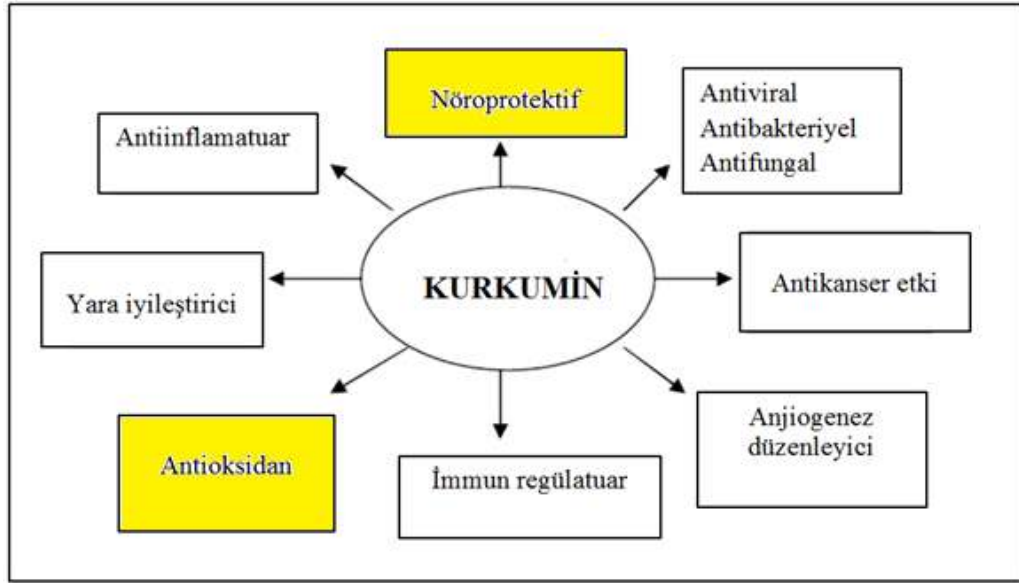
2.5.3. Kurkuminin Antioksidan Etkileri

Kurkuminin antioksidan özellikleri sonucu böbrek, kalp, beyin dokusu ile karaciğer iskemik hasarında oksidatif stresi ve doku hasarlanmasını azalttığı gösterilmiştir. CUR'nin, Vitamin C ve E ile karşılaştırılabilir nitelikte antioksidan aktivitesi mevcuttur (163). CUR antioksidan etkinliğini, ksantin dehidrogenazın (XD) ksantin oksidaza (XO) dönüşümünü önlemesi, lipid peroksidasyonunun oluşumunu engelleyerek ve iskemik ortamda bulunan serbest oksijen radikallerini (102) toplayarak göstermektedir (151). CUR, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitelerini artırarak hücre zarında bulunan lipidlerin peroksidasyonunu da azaltır (164). CUR'nin yapısındaki fenolik ve metoksi gruplarının serbest radikallerle reaksiyona girmesiyle fenoksil radikali oluşmaktadır (165). Ayrıca CUR'nin primer metaboliti tetrahidrokurkumin, iki karbonil grubu arasındaki aktif metilen karbonundaki C-C bağına kırılarak antioksidan etki yapar. Bu antioksidan etkileriyle ROS oluşumunu doğrudan veya XD'nin XO'a dönüşümünün inhibisyonu ile dolaylı olarak etkileyerek engellemektedir. Ancak CUR'nin diğer hidroksil radikalleri veya peroksinitrit üzerindeki etkisi henüz aydınlatılamamıştır (166).

Kronik inflamasyon ve sitokinler nitrik oksit (NO) sentezini indükleyerek DNA hasarına ve kansere neden olan peroksinitrit ve nitrit oluşumuna yol açmaktadır. Yapılan pek çok çalışmada CUR'nin NO sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (167).

2.5.4. Kurkuminin Diğer Biyolojik Etkileri

Kurkumin üzerine yapılan deneysel çalışmalarda CUR'nin antiinflamatuvar, antioksidan, yara iyileştirici gibi çok geniş farmakolojik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (158). Aşağıda CUR'nin biyolojik etkileri Şekil 5'te gösterilmektedir.



Şekil 5: Kurkuminin biyolojik etkileri

Bazı çalışmalar travmatik beyin hasarına veya serebral iskemik hasarlanmaya karşı CUR'nin nöroprotektif etkilerini göstermiştir (168, 169). Sng ve ark. kainik asitin indüklediği epileptik nöbet krizinde (epileptik status) CUR tedavisinin histon modifikasyonunu azalttığını saptamışlardır. Epileptik kriz veya beyin hasarını nöronlardan ve astrositlerden kaynaklanan glutamat konsantrasyonlarında patolojik artışlar takip eder (170).

Sumanont ve ark. (171) deneysel epilepside oksidatif strese bağlı nöronal hasarın tedavisinde, nöroprotektif özellik sergileyen CUR ve diasetilcurcuminin, Mn komplekslerinin kullanılabileceğini göstermişlerdir. Shin ve ark. CUR'nin kainik asite bağlı hipokampal hücre ölümünü neredeyse tamamen azalttığını göstermişlerdir. Bu durumun en güçlü kanıtı, CUR'nin oksidatif stresin indüklediği nöronal hücre ölümünde belli düzeyde nöroproteksiyon sağlayabiliyor olmasıdır. CUR, kainik asite bağlı upregüle olan kaspaz-3 ve GFAP ekspresyon düzeylerini azaltır, ki bu durum CUR'nin nöronları oksidatif strese bağlı astrogliosis'e karşı koruyor olabileceğini düşündürmektedir (172). Beyin senesensi kognitif disfonksiyon ve nörodejeneratif hastalıklarda önemli rol oynar. CUR'nin senesens sürecine etkisi Şekil 6'da gösterilmiştir.

CUR'nin AH da dahil çok sayıda nörodejeneratif hastalığa karşı yararlı etkileri bildirilmiştir (173, 174). Işık ve arkadaşları serebral ventrikül içine streptozotosin (STZ) enjeksiyonu ile geliştirilen deneysel AH modelinde CUR tedavisinin IGF-I'i (insülin like growth faktör) artırarak nörogenez ve nöroproteksiyonda etkili olduğunu, STZ ile oluşturulan

kognitif hasar ve nörodejenerasyonun CUR tedavisi ile iyileştirilebildiğini göstermişlerdir (174).

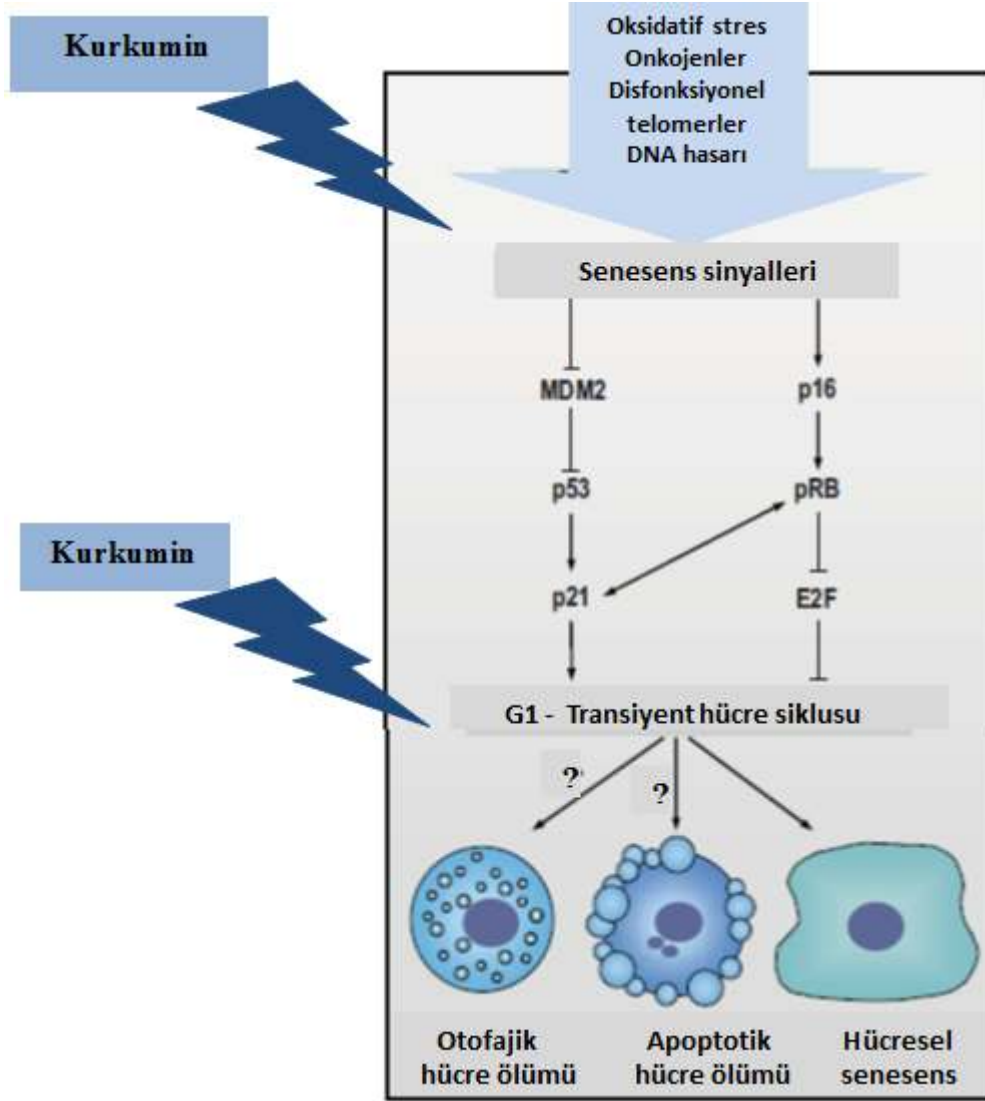
Beyinde fazla nitrik oksid (NO) üretimi nörotoksisite ve nörodejenerasyonla ilişkilidir; nöronları çevreleyen astrositlerin NO üretimi bu olaylara anlamlı şekilde iştirak etmektedir. Bunun için NO üretiminin supresyonu özellikle bu hastalıkların progresyonunun geciktirilmesinde fayda sağlayabilir. İmmünohistokimyasal veriler, eNOS'un mikrovasküler yapıda bulunduğu kadar, beyaz ve gri cevherdeki astrositlerde de yer aldığını ortaya koymuştur (175). Diyabetik ratların kalbinde CUR'nin, eNOS ve iNOS düzeylerini azalttığı; aktivitesinin DNA ve proteinin her ikisindeki oksidatif hasarda azalmayla ilişkili olduğunu göstermektedir (176). Shin ve ark. tarafından kainik asit uygulanan farelerin astrositlerinde ve mikrovasküler yapıda artmış eNOS ekspresyonu gösterilmiş, bu durum CUR tedavisi ile ekspresyonun oluşmaması ile doğrulanmıştır (172).

CUR'nin kan kolesterol düzeyini düşürücü etkisi (177), immün sistem hücrelerinde bulunan çeşitli inflamatuvar sitokinleri ve sinyal iletim yollarını regüle edici etkisi nedeniyle multiple skleroz, psöriazis ve irritabl barsak sendromunda iyileştirici etkisi (178), nükleer faktör- κ B (NF- κ B) inhibisyonu ile inflamasyonu azaltıcı etkisi nedeniyle de skleroderma, psöriasis ve cilt kanseri olmak üzere çeşitli cilt rahatsızlıklarında önleyici ve tedavi edici etkisi (160) olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, CUR'nin deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlarda glikoz düzeyini düşürücü etki gösterdiği bulunmuştur (179).

CUR plazma kolesterol, lipoproteinler ve trigliserit düzeylerini azaltarak ateroskleroz gelişimini önlediği ileri sürülmüştür (180).

CUR antikanserojenik etkilidir, bu etkisinin en önemli sebeplerinden biri de kanser hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu, anjiogenezi ve apoptozun baskılanmasında rol alan NF- κ B' nin potansiyel bir blokörü olmasıdır (160, 181).

CUR radyasyon hasarında yara iyileşmesini arttırıcı etki göstermektedir. Bu etkisini yaradaki fibroblast aktivitesini arttırarak, kollajen depolanmasını ve DNA sentezini arttırarak etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sıçanlarda oluşturulan akut gastrik ülser modelinde lipid peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu önleyerek ve glutatyon azalmasının önüne geçerek ve gastrik lümen reepitelizasyonunu sağlayarak akut ülsere karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir (182).



Şekil 6: Kurkuminin senesens sürecine etkisi [Vicencio ve ark.'ın (183) çalışmasından uyarlanmıştır].

Yiyeceklerde ve giyim ürünlerinde renk verme amacının dışında E.coli ve S.aureus'a karşı bakterisidal etkinlik göstermesi nedeniyle önerilmiş ve bu etkinliği mikrobiyolojik olarak da ispatlanılmıştır (184).

2.5.5. Güvenlik

Serum kurkumin konsantrasyonları en yüksek oral alımın ardından 1-2 saat sonra saptanmış ve daha sonra 12 saat içinde de kademeli olarak azaldığı gösterilmiştir. CUR ile yapılmış hayvan çalışmalarında 5g/kg'ın üzerindeki dozlarda bile toksisite bulgularına rastlanmamıştır. Sistemik prelinik çalışmalarda Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü kanserden korunma bölümünde ratlarda, köpeklerde, maymunlarda 3,5 g/kg üzerindeki dozlarda üç aydan uzun kullanımda yan etki saptanmamıştır (185).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan gerekli histolojik ve kimyasal malzemeler Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 2012.KB.SAG.068 nolu proje ile desteklenmiştir. Ayrıca çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu'nun 21/2012 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

3.1. DENEY HAYVANLARI VE LABORATUAR ŞARTLARI

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Deneysel Araştırma laboratuvarından temin edilen 250-350 gr ağırlığında 48 adet Wistar türü erkek sıçan (6 ve 12 aylık) kullanıldı. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar deney hayvanları laboratuvarında uluslararası hayvan deney ve bakım kılavuzlarına göre standart laboratuvar koşullarında (12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, $62\pm 7\%$ nem oranı) barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi.

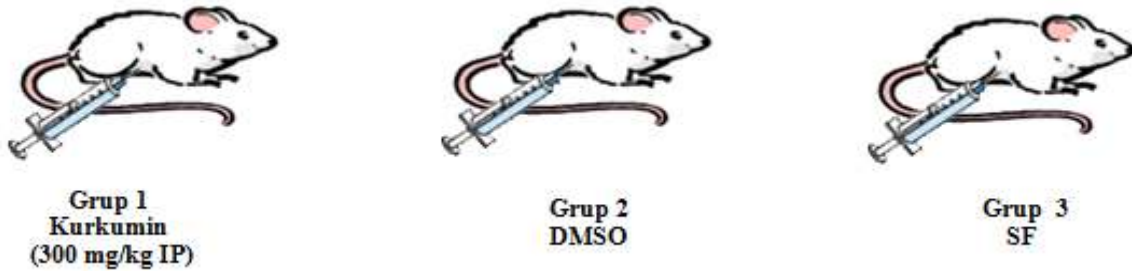
3.2. ÇALIŞMA DİZAYNI (Şekil 7) (Grafik 1)

Sıçanlar 6 ve 12 aylık olmak üzere 2 gruba ayrıldı. 6 aylık sıçan grubu Grup A, 12 aylık sıçan grubu Grup B olarak isimlendirildi. A ve B grubu rastgele 3 alt gruba ayrıldı.

Grup 1 : Kurkumin grubu [deney grubu (n:16)]: 6 hafta süreyle 300mg/kg/gün (163, 174) kurkumin intraperitoneal (IP) yolla verildi. Kurkumin dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü (A grubu için 0,2 ml, B grubu için 0,4 ml DMSO).

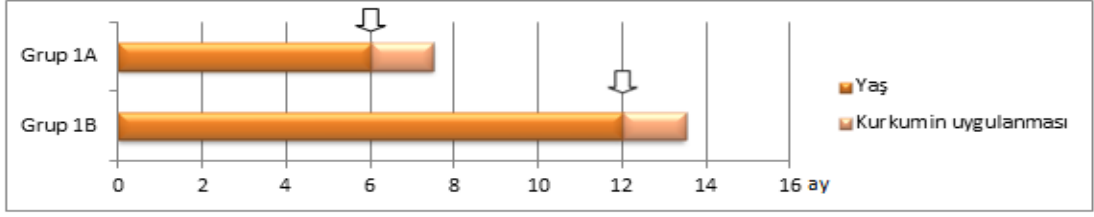
Grup 2 : DMSO grubu [(+) kontrol grubu (n:16)]: 6 hafta süreyle IP yolla DMSO verildi (A grubu için 0,2 ml, B grubu için 0,4 ml DMSO).

Grup 3 : SF grubu [(-) kontrol grubu (n:16)]: 6 hafta süreyle IP yolla 0,4 ml serum fizyolojik verildi.

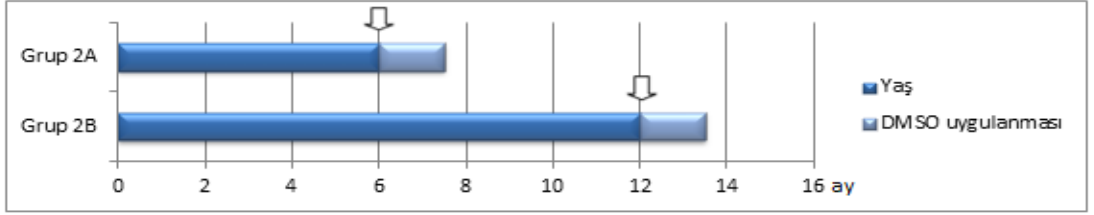


Şekil 7: Çalışma dizaynı gösterilmiştir.

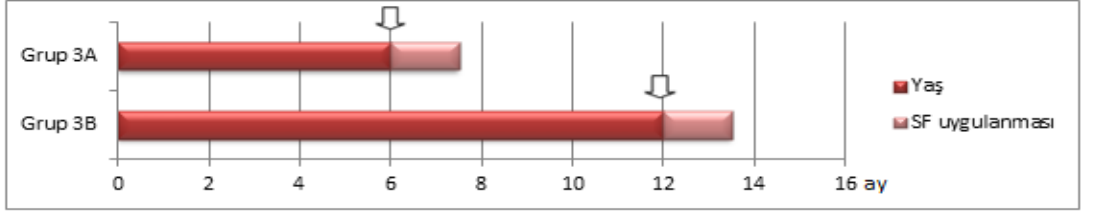
Grup 1 : Kurkumin



Grup 2 : DMSO grubu



Grup 3 : SF Grubu



Grafik 1: Çalışma dizaynı gösterilmiştir.

Deney sıçanlardan eter anestezisi altında intrakardiyak kan alınması ve beyin dokusunun hızla çıkarılması (Resim 4) işlemi ile sonlandırıldı. Elde edilen beyin dokusu örneklerinden histolojik incelemelerin gerçekleştirileceği sol hemisfer %10'luk formaldehit ile tespit edildi, sağ hemisfer düz tüpe alınarak -80°C'de dolaplara alındı. Kan örnekleri ise 5000 rpm'de beş dakika santrifüj edildikten sonra eritrositler distile su ile dilüe edilerek doku örnekleri ile birlikte -80°C'de analiz gününe kadar saklandı.



Resim 4: Sıçanlardan intrakardiyak kan alınması ve beyin dokusunun çıkarılması.

Deney ve Laboratuvar İncelemeleri Sırasında Kullanılan Materyaller ve Cihazlar:

- ❖ Işık mikroskop (Olympus BH-2 Tokyo, Japan)
- ❖ Mikrotom (RM 2255, Leica)
- ❖ Digital kamera (Olympus DP71) ve (JVC TK 890E, Japan)
- ❖ Santrifüj (Sigma1-14 ve Rotofix 32, Hettich Zentrifugen)
- ❖ Hassas Terazî (Sartorius, GC803S-0CE ve Sartorius, BP2215)
- ❖ Otomatik Pipet (Eperndorf)
- ❖ Mikrodalga fırın (Galanx)
- ❖ Etüv (Dedeoğlu)
- ❖ Vorteks (Velp Scientifica)
- ❖ Rodajlı lam (Isotherm 76X26 mm)
- ❖ Lamel (Citoglas 24X60 mm)
- ❖ Doku homojenizatörü (Schütt-Homgen plus)
- ❖ Spektrofotometre (GBC Cintra 303, Avustralya, Seri no:V3772)
- ❖ Buzdolabı (Revco, Asheville NC USA, Seri no: U130-270376-UO)

Kimyasallar

- ❖ Kurkumin (C1386, Sigma Aldrich)
- ❖ DMSO (Dimetil Sülfoksit) (M802912.1000, Merck)
- ❖ β -galaktozidaz (ab9361, Abcam)
- ❖ CD-133 (bs-0395R, BIOSS)
- ❖ Nestin (sc-33677, Santa Cruz)
- ❖ GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) (18-0063, Invitrogen, CA)
- ❖ Trypsin (Kat No: 00-3008 Digest All 2A, Zymed, San Francisco, California, CA)
- ❖ Sekonder Kit (Invitrogen, Histostain- Plus Broad Spectrum Cat No: 85-9043)
- ❖ Diaminobenzidin (DAB) (Katolog no: 1718096, Roche)
- ❖ Fosfat buffer solusyonu (PBS), SH30256.02, Thermo)
- ❖ Epoxy Resin kit (R1030, AGAR)
- ❖ CAPS (Amnesco, Ohio, USA)
- ❖ Ksantin Na (Sigma Aldrich, St.Louis, MO)
- ❖ I.N.T. (Iodonitrotetrazolium) (Sigma Aldrich, St.Louis, MO)
- ❖ EDTA (Etilendiamintetraasetik asit) (Sigma Aldrich, St.Louis, MO)

- ❖ Ksantin oksidaz (Sigma Aldrich, St.Louis, MO)
- ❖ Standart SOD çözeltileri (Sigma Aldrich, St.Louis, MO)
- ❖ Trikloroasetik Asit Çözeltisi (TCA) (Sigma Aldrich, St.Louis, MO)
- ❖ TBA Çözeltisi (tiyobarbütirik asit) (Sigma Aldrich, St.Louis, MO)
- ❖ Fosfat Tamponu (Sigma Aldrich, St.Louis, MO)

3.3. DEĞERLENDİRMELER

3.3.1. Histolojik Değerlendirme

3.3.1.1. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Deney süresi sonunda elde edilen beyin doku örnekleri %10'luk formaldehit ile tespit edildi. Dokular fiksatiflerin uzaklaştırılmaları amacıyla bir gece musluk suyu altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika dört değişim aseton solusyonlarından geçirildikten sonra iki değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde iki değişim parafin uygulanıp birer saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisinde gömüldü. Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla subventriküler bölge (186) ve hipokampusten (186) mikrotom aracılığı ile 5µm'lik ince kesitler alındı (Tablo 1).

Tablo 1: Işık mikroskopik doku takip prosedürü

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 formalin,	24 saat-48 saat
Fiksatifin uzaklaştırılması	Musluk suyu	bir gece
Dehidratasyon	% 70 etil alkol	20 dakika
	% 80 etil alkol	20 dakika
	% 96 etil alkol	20 dakika
	Aseton (dört değişim)	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol	30 dakika
	Ksilol	30 dakika
Emdirme 60 °C etüv	Parafin	bir saat
	Parafin	bir saat
Gömme	Parafin	

Cresil Violet Boyaması: 60 °C'de deparafinize edilen kesitler üç değişim ksilolden geçirildi. Ardından azalan alkol serilerinden geçirilen dokular distile su ile yıkandı ve 30 dakika cresil violet ile boyandı. %96'lık alkolden geçirilen dokular ksilol ile şeffaflaştırıldıktan sonra entellan ile kapatıldı ve ışık mikroskobu ile incelendi (Tablo 2).

Tablo 2: Cresil violet boyama prosedürü

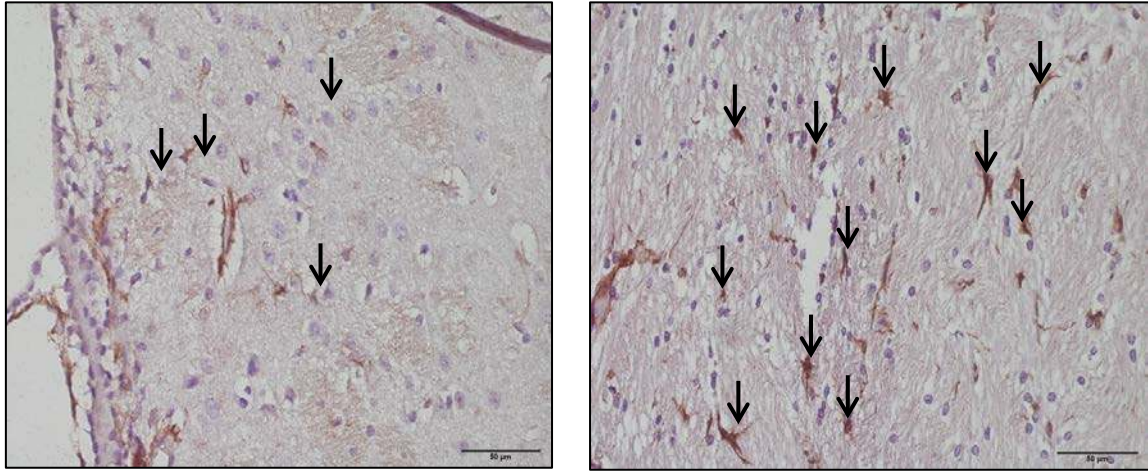
İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	Bir gece
Deparafinizasyon	Ksilol (üç değişim)	20 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 96 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Cresil violet ile boyama		30 dakika
Dehidratasyon	% 96 alkol	Batırıp çıkarma
Kapama	Entellan	

3.3.1.2. İndirekt İmmunohistokimyasal Yöntem

Nöral kök hücreler CD133, GFAP ve nestin eksprese ederler (35). Senesens ilişkili beta galaktozidaz (SA-b-Gal) ise yaygın olarak kullanılan senesens biyobelirteçlerinden biridir (79, 80). Bu nedenle çalışmamızda immunohistokimyasal boyama için β -galaktozidaz (ab9361, Abcam), CD-133 (bs-0395R, BIOSS), Nestin (sc-33677, Santa Cruz) ve GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein, 18-0063, Invitrogen, CA) primer antikorları kullanıldı. Immunohistokimyasal inceleme için 60°C lik etüvde bir gece ve ksilolde üç değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı. Dokuya zarar vermeden kurulanıp dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı. Tripsin (00-3008, Digest All 2A, Zymed, San Francisco, California, CA) solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. Üç defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler bir saat oda ısısında bloklama solusyonu (Zymed Histostain-Plus Broad Spectrum Cat No:85-9043) ile inkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan **β -galaktozidaz, CD-133, Nestin ve GFAP** primer antikorları

ile bir gece +4°C’de inkübe edildi. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile üç defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (Zymed Histostain- Plus Broad Spectrum Cat No:85-9043) ile 30 dakika inkübe edildi. PBS solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (Histostain-Plus Broad Spectrum Cat No:85-9043) 30 dakika uygulandı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) (1718096, Roche) kullanıldı. Zemin boyaması Harris hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 3).

İndirekt immunohistokimyasal boyamalar semikantitatif yöntem ile skorlandı. Bu yöntemle göre 0: Boyanma yok, 1: Az boyanma, 2: Orta boyanma, 3: Şiddetli boyanma olarak belirlendi (Resim 5) (187). Sonuçlar tanımlayıcı istatistiksel yöntemle değerlendirildi. Değerlendirilecek olan primer antikorlar seri kesitlerde ardışık olarak boyandı. Her deneye ait preparatlardan üç rastgele alanda çalışmadan haberi olmayan iki histolog tarafından değerlendirme yapıldı, ortalamalar tanımlandı. İmmun boyanmalar alınan subventriküler zondaki alanda yapıldı.



Resim 5: Subventriküler zon, solda ‘az boyanma’, sağda ‘şiddetli boyanma’ya örnek ışık mikroskopik görüntü verilmiştir (x 40 büyütme).

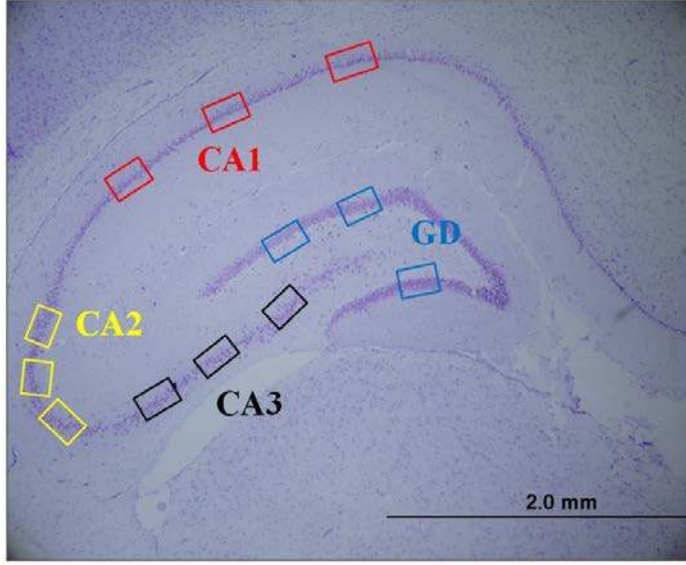
Tablo 3: İndirekt immunohistokimyasal yöntem

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	Bir gece
Deparafinizasyon	Ksilol (üç değişim)	20 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 96 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Tripsin	37°C, 15 dk
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solusyonu	Bir saat
Antikor ile inkübasyon	β -galaktozidaz, CD-133, Nestin ve GFAP	Bir gece, 4°C
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Biotinlenmiş sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Streptavidin sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	5 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt Boyama	Mayer's hematoksilen	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Kapama	Entellan	

3.3.1.3. Hipokampuste Nöron Yoğunluğunun Belirlenmesi

Hipokampuse ait CA1, CA2, CA3 ve Gyrus dentatus (186) bölgelerinin her birinden üçer alanda (Resim 6) olmak üzere nöron yoğunluğu sayımı yapıldı. Işık mikroskopuna bağlı olan (Olympus BH-2 Tokyo, Japan) yüksek çözünürlüklü video kamera (JVC TK 890E,

Japan) aracılığı ile 15800- μm^2 'lik sayım çerçevesinde x20'lik büyütmede nöron sayımı gerçekleştirildi (188) (Resim 6).



Resim 6: Hipokampuste nöron sayımının gösterilmesidir (x 4 büyütme). (Araştırma deneklerinden alınan beyin dokusu görüntüsüdür.)

3.3.2. Farmakolojik Değerlendirme

3.3.2.1. Eritrositlerde CUZN-SOD Aktivite Tayin Yöntemi

Bu yöntemde ksantin oksidaz (XOD) sistemiyle superoksit radikali üretildi, oluşan superoksit radikali I.N.T. (Iodonitrotetrazolium) ile reaksiyon vererek viyole renkli formazon boyası oluşturuldu ve bu renk şiddeti 505 nm dalga boyunda ölçüldü. Ortamdaki CuZn-SOD aktivitesine bağlı olarak bu reaksiyon önlendi ve yüzde (%) inhibisyon hesaplandı (189).

3.3.2.1.1. Test İçin Gerekli Kimyasal ve Reaktiflerin Hazırlanması

Substrat karışımı

Ksantin Na	0,05 mmol/L
I.N.T.	0,025 mmol/L

Tampon (pH 10.2)

CAPS (3-[Sikloheksilamino]-1-propensülfonik asit)	50 mmol/L
EDTA(Etilendiamintetraasetik asit)	0,94 mmol/L
Ksantin oksidaz	80 U/L
Standart SOD çözeltileri	0,217-5,20 U/L

3.3.2.1.2. Reaksiyon Ortamının Hazırlanışı

100 ml'lik karışım için 1107 mg CAPS ile 34,98 mg EDTA tartılarak 100 ml'ye tamamlandı ve pH'sı NaOH çözeltisi veya fosforik asit ile 10,2'ye ayarlandı. Bu çözeltiye 0.871 mg ksantin sodyum ve 1,264 mg INT eklendi.

3.3.2.1.3. Ksantin Oksidaz

80 U/l konsantrasyonda ksantin oksidazdan pH 7 fosfat tamponu içerisinde kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

3.3.2.1.4. Fosfat Tamponu (pH 7.0)

500 ml hazırlamak için 0,6805 g KH_2PO_4 tartılıp 500 ml'lik balon jojeye ilave edildi, bir miktar distile su ilave edilerek çözüldü. Üzerine 15 ml 0,2 M NaOH ilave edilerek hacmine tamamlandı ve pH 7 fosforik asid veya NaOH ile ayarlandı.

3.3.2.1.5. Testin Yapılışı

CuZn-SOD ölçümü için daha önceden 1:5 oranında dilüe edilerek hazırlanan eritrosit örneklerinden 0,1 ml alındı ve üzerine 7,9 ml distile su ilave edilerek toplam 400 katlık dilüsyon sağlandı ve ölçüm için kullanıldı. 1 ml'lik kuvars spektrofotometre küvetine 850 µl substrat karışımı ilave edildi. Üzerine 25 µl dilüe eritrosit ilave edildi ve en sonda üzerine 125 µl ksantin oksidaz (80 U/L) ilave edilerek 505 nm'de havaya karşı 30'uncu (A_1) ve 210'uncu (A_2) saniyelerde absorbens ölçüldü. Kör olarak 25 µl eritrosit yerine pH 7'lik fosfat tamponu kullanılıp aynı işlem tekrarlandı. Yine standart kalibrasyon eğrisi için de 0,217; 0,650; 1,30; 2,60 ve 5,20 U/ml konsantrasyonlarda CuZn-SOD içeren çözeltiler hazırlandı ve aynı işlem bunlar için de uygulandı. Absorbans ölçümlerinden sonra hem kör, hem numune, hem de standart için dakikadaki absorbens değişimi (ΔA) hesaplandı:

$$A_2 - A_1$$

$$\frac{\quad}{3} = \Delta A / \text{dakika (numune, standart ve kör için)}$$

3

Sonuç olarak köre karşı % inhibisyon değerleri hem standart hem de numune için hesaplandı:

$$(\Delta A_{\text{std}} / \text{dakika} \times 100)$$

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{\quad}{\Delta A_{\text{kör}} / \text{dakika}}$$

$$\Delta A_{\text{kör}} / \text{dakika}$$

Standartlar için elde edilen % inhibisyon, standart konsantrasyonlarının logaritmalarına karşı grafiğe geçirilerek doğru denklemi hesaplandı. Numuneler için elde edilen % inhibisyon değerleri de bu grafiğe uygulanarak konsantrasyonları U/ml olarak hesaplandı. Sonra dilüsyon faktörü olan 400 ile çarpılarak eritrositlerdeki aktivite hesaplandı.

3.3.2.2. Eritrosit SE-GPX Aktivite Tayin Yöntemi

Se-GPx aktivite tayin yönteminin esası, H₂O₂ varlığında indirgenmiş glutatyonun (GSH) Se-GPx tarafından okside glutatyon (GSSG) oksitlenmesi ve oksitlenen GSSG'nin glutatyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'ye dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADPH) kullanılması ve kullanılan bu NADPH miktarındaki, dolayısıyla absorbanstaki azalmanın 340 nm dalga boyunda izlenmesi esasına dayanmaktadır (190, 191).

3.3.2.2.1. Test İçin Gerekli Kimyasal ve Reaktiflerin Hazırlanması

Reaksiyon ortamı; 50 mmol/l tris tamponu pH 7,6 içinde, litrede 1 mmol Na₂EDTA, 2 mmol redükte glutatyon, 0,2 mmol NADPH, 4 mmol sodyum azid ve 1000 ünite glutatyon redüktaz olacak şekilde hazırlandı. H₂O₂, distile su içerisinde 8,8 mmol/l konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı.

3.3.2.2.2 Testin Yapılışı

Daha önceden 1:5 oranında dilüe edilerek hazırlanan eritrosit hemolizatu oda ısısında çözüldü ve üç kat dilüe edildi. 1 ml'lik küvete 990 µl reaksiyon ortamı ilave edildi, buna 10 µl dilüe hemolizat eklendi ve oda ısısında beş dakika inkübe edildi. 10 µl H₂O₂ eklenerek reaksiyon başlatıldı ve NADPH absorban azalması 340 nm'de iki dakika izlendi. Nonenzimatik reaksiyon için aynı şartlarda hemolizat yerine 10 µl distile su kullanılarak

küvette NADPH azalması kaydedildi ve her bir ölçümden çıkarıldı. Sonra dakikadaki absorbans farkı hesaplandı. Aynı şartlarda dilüe örnekler yerine 0,1-0,5 U/ml standart GPx çözeltileri kullanılarak kalibrasyon grafiği elde edildi. Örneklerdeki enzim aktiviteleri bu grafikten hesap edildi.

3.3.2.3. Eritrosit Malondialdehit Tayin Yöntemi (TBARS)

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehit (MDA) tayini, tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın reaksiyon vererek 532 nm dalga boyunda ölçülebilen renkli bir bileşik vermesi esasına dayanmaktadır. Bu ölçümle tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler ölçüldü, literatürde tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) olarak yer almaktadır (192).

3.3.2.3.1. Gerekli Reaktiflerin Hazırlanması

Trikloroasetik Asit Çözeltisi (TCA): %15 konsantrasyonda trikloroasetik asitten distile su içerisinde hazırlandı.

EDTA Çözeltisi: 0,1 M konsantrasyonda EDTA disodyum dihidrattan distile su içerisinde hazırlandı.

TBA Çözeltisi: % 1 konsantrasyonda tiyobarbitürik asitten 0,05 N NaOH içerisinde hazırlandı.

Fosfat Tamponu pH 7.5 (0.33M): 11,931g disodyum hidrojen fosfat tartılıp 100 ml'ye distile su ile tamamlandı (A çözeltisi). 0,907 g potasyum dihidrojen fosfat tartılıp 20 ml'ye distile su ile tamamlandı (B çözeltisi). Sonra 85 ml A çözeltisi ile 15 ml B çözeltisi karıştırılarak pH tespit edildi. Fosforik asit veya sodyum hidroksit ile pH 7,5'a ayarlandı.

3.3.2.3.2. Testin Yapılışı

1:5 oranında dilüe edilerek hazırlanan eritrosit örneklerinden 0,5 ml alınarak üzerine 0,5 ml pH 7,5'luk fosfat tamponu ilave edildi. Sonra bunların üzerine 0,5 ml %15'lik trikloroasetik asit solüsyonu ilave edilerek vortekslendi ve buzdolabında buz keseleri üzerinde iki saat tutuldu. Ardından tüpler 4°C'de 4400 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Sonra bir ml supernatan alınarak başka bir polipropilen tüplere aktarıldı, üzerine 75 µl 0.1 M EDTA ve 250 µl 0,05 N NaOH içerisinde hazırlanmış %1'lik TBA solüsyonu ilave edilip 15 saniye vortekslendi ve kaynayan su banyosunda 15 dakika tutuldu. Aynı şartlarda bir ml supernatan yerine bir ml pH 7,5'luk fosfat tamponu kör olarak ve bir ml standart da kalibrasyon eğrisi için kullanıldı. Sonra absorbanslar 532 nm dalga boyunda köre karşı spektrofotometrede ölçüldü. Her örnek için iki ölçüm yapılarak ortalaması kullanıldı. Standart olarak tetrametoksipropen (TMP) solüsyonu kullanıldı, bu amaçla 0,76 ile 3,04 nmol/ml'lik

konsantrasyon arasında beş standart stok TMP'den hazırlandı. Numunelerdeki MDA konsantrasyonu nmol/ml olarak doğrudan kalibrasyon eğrisinden hesap edildi. Solüsyonlar her seferinde taze hazırlandı.

3.3.2.4. Beyin Dokusunda Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi

Antioksidan Enzim Ölçümü

Dokuların tartımları alınarak ($0,6173 \pm 0,052$ gram), Schütt-Homgen plus marka doku homojenizatöründe %1,15 KCl kullanılarak homojenatları hazırlandı. Bu homojenatlar üzerinde, aşağıda açıklanan parametrelerin tayinleri gerçekleştirildi.

Homojenatlar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5000xg devirde santrifüj edildi. Elde edilen şeffaf süpernatant çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan biyokimyasal reaksiyonlar için kullanıldı.

3.3.2.4.1 Beyin dokusunda Süperoksid Dismutaz (SOD) aktivite ölçümü

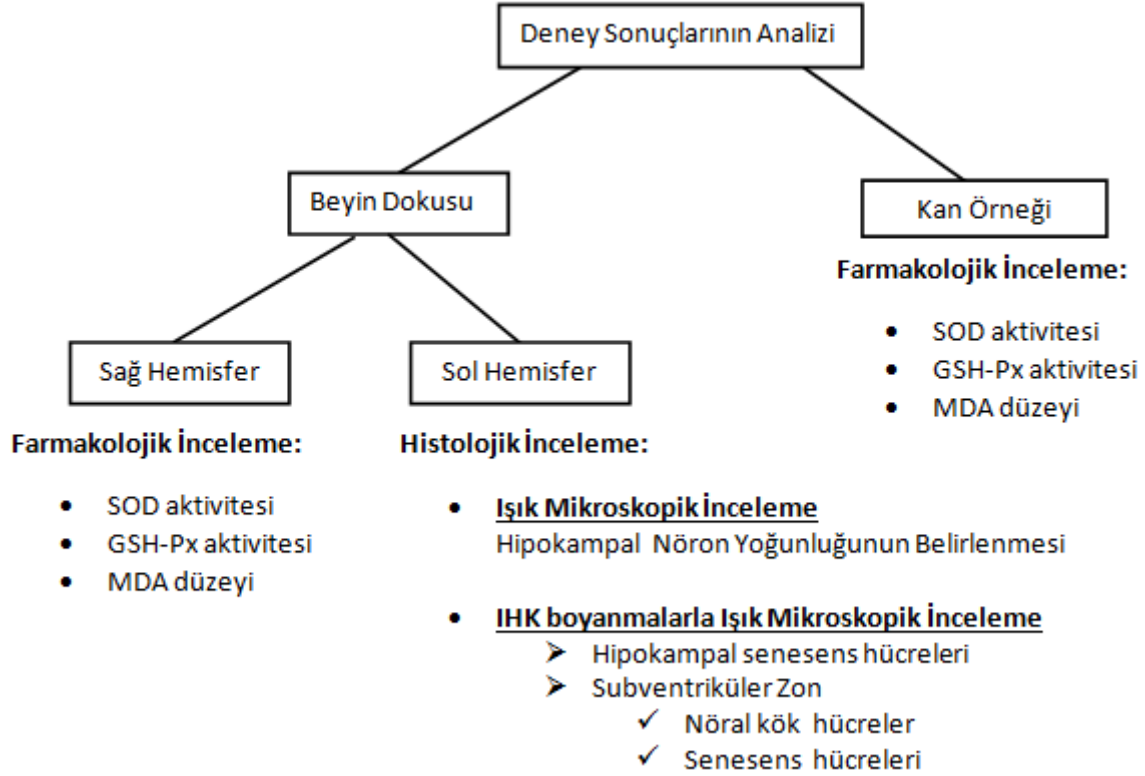
Supernatanda CuZn-SOD aktivite Bulucu ve arkadaşlarının (193). CAPS hariç (Amnesco, Ohio, USA) tüm ayıracılar Sigma kimyasallarından (St.Louis, MO) sağlandı. Her bir supernatant 1:400 kat 10 mM fosfat tamponu ile dilüe edildi. Dilüe edilen süpernatanın pH 7'de 25 μL 'si pH 10,2'de 50mmol/L CAPS ve 0,94 mmol/L EDTA içeren tampon solüsyonu içerisinde 0,05 mmol/L ksantin sodium ve 0,025 mmol/L INT klorid içeren 850 μL substrat solüsyonu ile karıştırıldı. Daha sonra ksantin oksidazın (80U/L) 125 μL 'si karışıma eklendi ve absorbans artışı havaya karşı üç dakikada 505 nm 'de gözlemlendi. 25 μL fosfat tampon örneğinde veya çeşitli standart konsantrasyonların 25 μL 'si standart tespitler için kullanıldı. CuZn-SOD aktivitesi ünite/gram (U/g) doku proteini olarak ifade edildi.

3.3.2.4.2. Beyin dokusunda Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) aktivite ölçümü

Süpernatanda glutatyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının (191) metoduna göre çalışıldı. Bütün ayıracılar Sigma kimyasallarından (St.Louis, MO) sağlandı. Reaksiyon karışımının pH 7,6'da 1mmol/L Na_2EDTA , 2 mmol/L indirgenmiş glutatyon (GSH), 0,2 mmol/L NADPH, 4mmol/L sodium azid ve 1000U glutatyon redüktaz, 50 μL supernatant ve 950 μL reaksiyon karışımı içeren 50mmol/L tampon karıştırıldı ve 37°C 'de 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon 8mmol/L H_2O_2 ile başlatıldı ve GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP^+ 'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplandı. Enzim aktiviteleri ünite/gram (U/g) doku proteini şeklinde belirtildi.

3.3.2.4.3. Beyin Malondialdehit Ölçümü

Deney ve kontrol gruplarından elde edilen supernatan örneklerinden lipid peroksidasyon ürünlerinin saptanması Buege ve Aust'un (194) TBARS oluşumu metoduna dayanılarak gerçekleştirildi. Doku örneklerindeki TBARS seviyeleri nmol/g olarak ifade edildi.



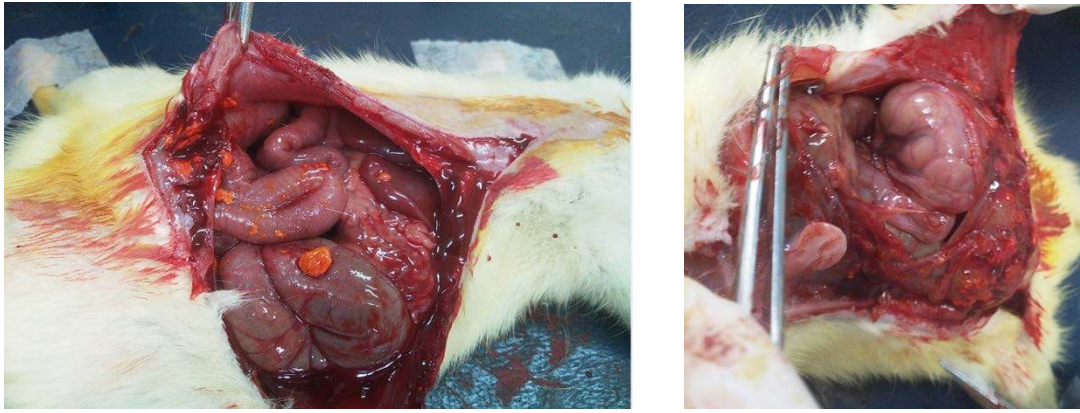
Tablo 4: Analiz yöntemleri özetlenmiştir.

3.3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Gruplar arası farklılık Kruskal Wallis, gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz için, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Version 15.0 for Windows (SPSS Inc, USA) adlı bilgisayar programı kullanıldı. $p < 0,05$; istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Verilerin karşılaştırılması için tablo ve grafikte gösterim yapıldı.

BULGULAR

Deney süresince Grup1A'dan bir sıçan peritonit nedeniyle, Grup 1B'den üç sıçan; ikisi peritonit, biri enjeksiyon sonrası olası anafilaksi reaksiyonu nedeniyle, Grup 3A'dan bir sıçan kemik destrüksiyonu yaratan boyun absesi nedeniyle kaybedildi. Deney sırasında gelişen hayvan ölümleri en fazla CUR grubunda gözlenmiştir ve en sık ölüm nedeni peritonittir. Sakrifikasyon aşamasında CUR grubunda bazı deneklerde periton inflamasyon bulguları ve visseral peritonda CUR kalıntıları gözlemlendi (Resim 7).



Resim 7: Sakrifikasyon aşamasında kurkumin grubunda gözlenen periton değişiklikleri ve kurkumin kalıntıları

HİSTOLOJİK BULGULAR

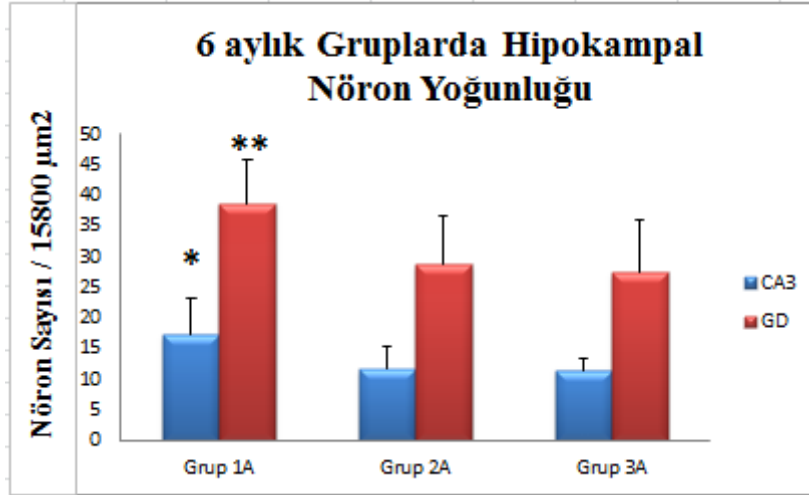
Hipokampal Nöron Yoğunluğu Işık Mikroskopik Bulgular

Hipokampuse ait CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerinin nöron yoğunlukları değerlendirildiğinde; 6 ve 12 aylık ratlarda, CUR uygulanan grup olan Grup 1 ile pozitif ve negatif kontrol grupları olan Grup 2 ve Grup 3 arasında CA1 ve CA2 bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken ($p>0,05$) CA3 ve GD bölgelerinde nöron sayısında CUR uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p<0,05$) (Grafik 2-3, Tablo 5, Resim 8).

Her iki yaş grubunda Grup 2 ve Grup 3 arasında ise CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark ($p>0,05$) saptanmadı (Tablo 5). CUR uygulanan 6 aylık (Grup 1A) ve 12 aylık (Grup 1B) ratlarda CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark ($p>0,05$) bulunmadı (Tablo 5).

Tablo 5: Hipokampüse ait CA1, CA2, CA3 ve GD bölgelerinin nöron yoğunlukları gösterilmektedir. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

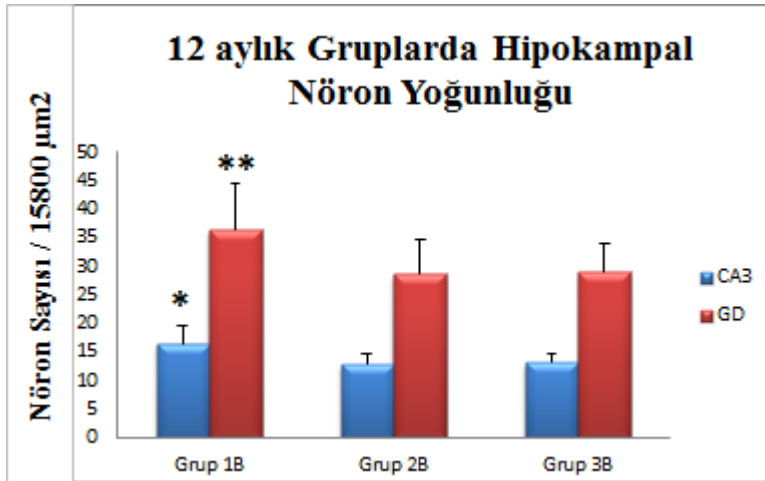
	CA1	CA2	CA3	GD
Grup 1A	21,7 $\pm$ 4,10	16,8 $\pm$ 6,30	17,2 $\pm$ 5,99	38,7 $\pm$ 7,00
Grup 1B	19,4 $\pm$ 5,46	17,8 $\pm$ 5,55	16,5 $\pm$ 2,99	36,3 $\pm$ 8,03
Grup 2A	19,0 $\pm$ 5,45	17,0 $\pm$ 3,71	11,7 $\pm$ 3,55	28,7 $\pm$ 7,85
Grup 2B	19,0 $\pm$ 3,98	16,7 $\pm$ 3,76	12,8 $\pm$ 1,91	28,5 $\pm$ 6,23
Grup 3A	19,05 $\pm$ 4,28	16,3 $\pm$ 4,28	11,4 $\pm$ 1,98	27,3 $\pm$ 8,74
Grup 3B	19,5 $\pm$ 2,64	17,8 $\pm$ 3,92	13,1 $\pm$ 1,67	28,9 $\pm$ 5,18
İkili gruplar arasındaki anlamlılıklar, Mann Whitney U testi				
	CA1	CA2	CA3	GD
Grup 1A-1B	p=0,275	p=0,579	p=0,881	p=0,750
Grup 1A-2A	p=0,012	p=0,405	p=0,004	p=0,001
Grup1A-2B	p=0,078	p=0,510	p=0,038	p=0,007
Grup1A-3A	p=0,070	p=0,87	p=0,002	p=0,000
Grup1A-3B	p=0,060	p=0,258	p=0,032	p=0,002
Grup1B-2A	p=0,717	p=0,731	p=0,002	p=0,023
Grup 1B-2B	p=0,776	p=0,565	p=0,004	p=0,026
Grup 1B-3A	p=0,806	p=0,401	p=0,000	p=0,006
Grup1B-3B	p=0,879	p=0,949	p=0,002	p=0,016
Grup2A-2B	p=0,908	p=0,709	p=0,070	p=0,985
Grup2A-3A	p=0,927	p=0,601	p=0,682	p=0,636
Grup 2A-3B	p=0,936	p=0,460	p=0,025	p=0,739
Grup 2B-3A	p=0,985	p=0,971	p=0,052	p=0,701
Grup 2B-3B	p=0,622	p=0,335	p=0,506	p=0,541
Grup 3A-3B	p=0,520	p=0,313	p=0,001	p=0,542



Grafik 2: 6 aylık gruplara ait CA3 ve Gyrus dentatus'ta (GD) nöron yoğunluğunun bar diyagram görünümü gösterilmektedir.

* : Grup 1A'da CA3 bölgesinde hipokampal nöron sayısı Grup 2A ve Grup 3A'ya göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).

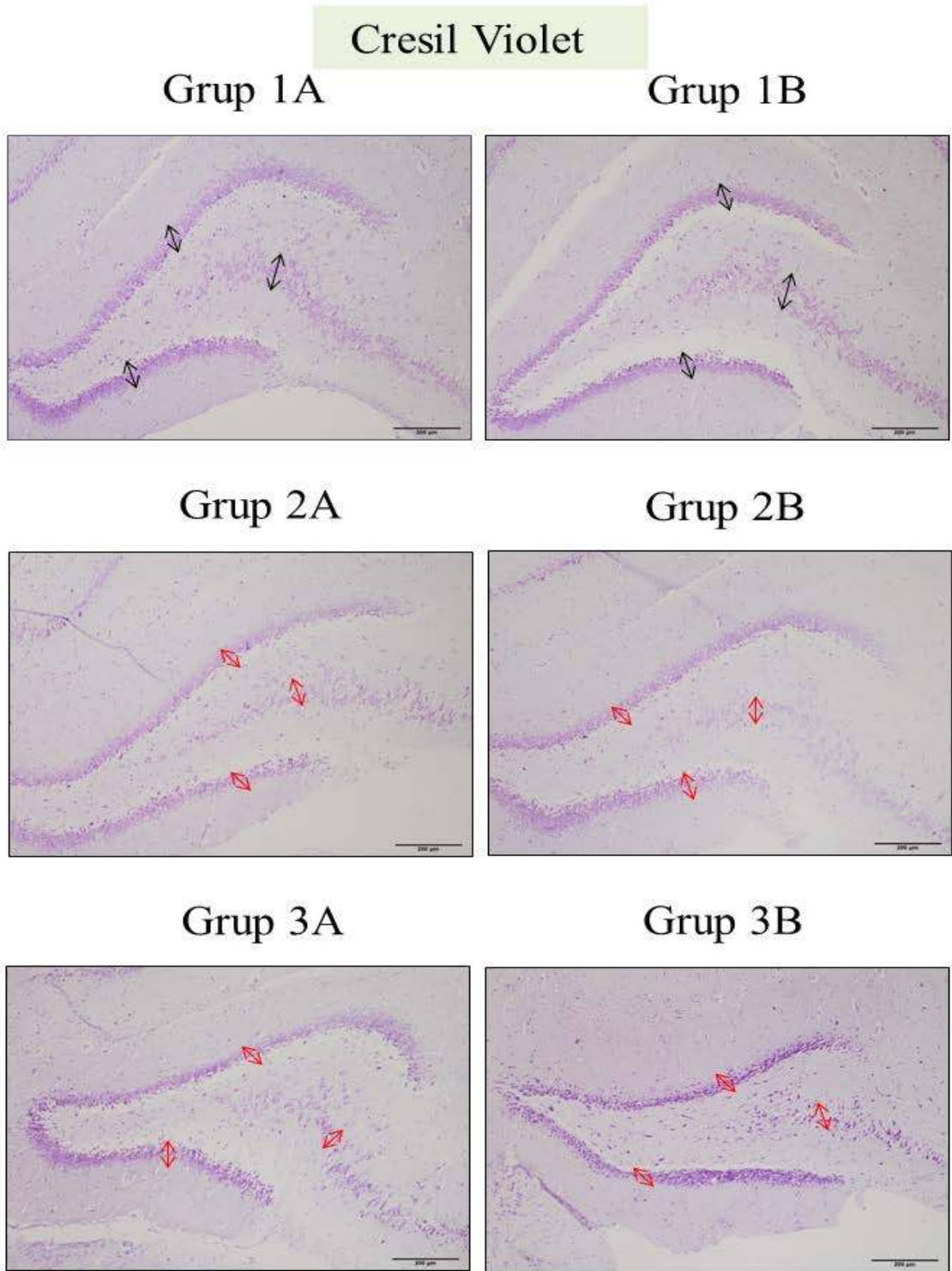
** : Grup 1A'da GD'de hipokampal nöron sayısı Grup 2A ve Grup 3A'ya göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).



Grafik 3: 12 aylık gruplara ait CA3 ve Gyrus dentatus'ta (GD) nöron yoğunluğunun bar diyagram görünümü gösterilmektedir.

* : Grup 1B'de CA3 bölgesinde hipokampal nöron sayısı Grup 2B ve Grup 3B'ye göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).

** : Grup 1B'de GD'de hipokampal nöron sayısı Grup 2B ve Grup 3B'ye göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).



Resim 8: Gruplara ait CA3 ve GD bölgelerinde Cresil violet boyanması görülmektedir (x10 büyütme).

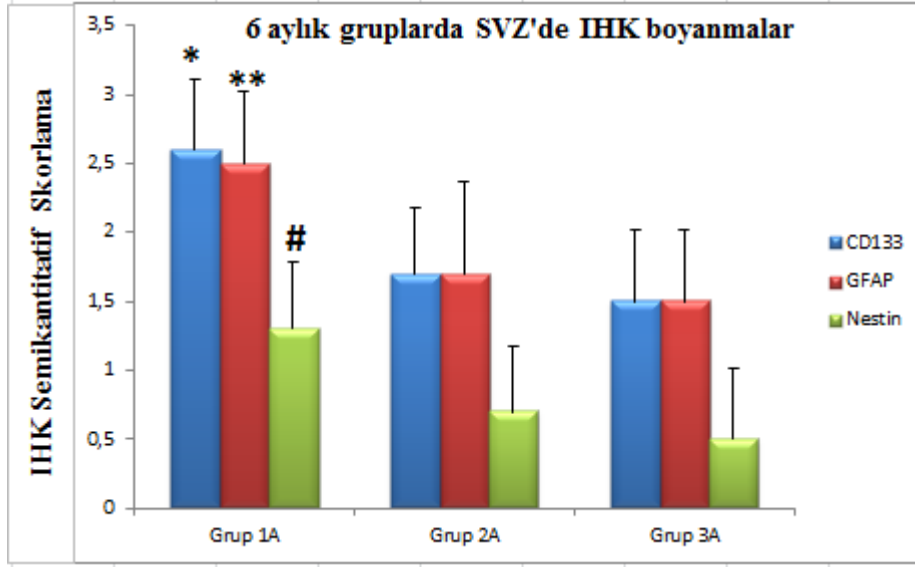
Siyah ok: Kurkumin verilen grupta CA3 ve GD'ye ait hücre yoğunluğunda anlamlı artış
Kırmızı ok: Kurkumin verilmeyen gruplarda CA3 ve GD'ye ait hücre yoğunluğunda azalma

Immunohistokimyasal Bulgular

Subventriküler zondaki CD133 immunhistokimyasal boyama sonuçları değerlendirildiğinde; 6 ve 12 aylık ratlarda, Grup 1’de Grup 2 ve Grup3’e göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p<0,05$) (Grafik 4-5, Tablo 6, Resim 9) . Her iki yaş grubunda Grup 2 ve Grup 3 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark ($p>0,05$) saptanmadı. Grup 1A ve Grup 1B arasında CD133 pozitif boyanma açısından istatistiksel olarak anlamlı fark ($p>0,05$) bulunmadı.

Tablo 6: Immunohistokimyasal semikantitatif skorlama. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. SVZ: Subventriküler Zon, GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein

	CD 133	Nestin	GFAP	Beta-galaktozidaz Hipokampus	Beta-galaktozidaz SVZ
Grup 1A	2,60 $\pm$ 0,51	1,30 $\pm$ 0,48	2,50 $\pm$ 0,52	0,00 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,42
Grup 1B	2,40 $\pm$ 0,51	1,30 $\pm$ 0,48	2,50 $\pm$ 0,52	0,00 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,42
Grup 2A	1,70 $\pm$ 0,48	0,70 $\pm$ 0,48	1,70 $\pm$ 0,67	0,00 $\pm$ 0,00	0,50 $\pm$ 0,52
Grup 2B	1,50 $\pm$ 0,52	0,50 $\pm$ 0,52	1,60 $\pm$ 0,51	0,30 $\pm$ 0,48	0,90 $\pm$ 0,87
Grup 3A	1,50 $\pm$ 0,52	0,50 $\pm$ 0,52	1,50 $\pm$ 0,52	0,00 $\pm$ 0,00	0,40 $\pm$ 0,51
Grup 3B	1,50 $\pm$ 0,52	0,30 $\pm$ 0,48	1,40 $\pm$ 0,52	0,20 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,90
İkili gruplar arasındaki anlamlılıklar, Mann Whitney U testi					
	CD133	Nestin	GFAP	Beta-galaktozidaz Hipokampus	Beta-galaktozidaz SVZ
Grup 1A-1B	p=0,383	p=1,000	p=1,000	p=1,00	p=1,00
Grup 1A-2A	p=0,002	p=0,017	p=0,013	p=1,00	p=0,170
Grup 1A-2B	p=0,001	p=0,005	p=0,003	p=0,067	p=0,047
Grup 1A-3A	p=0,001	p=0,005	p=0,002	p=1,00	p=0,342
Grup 1A-3B	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,067	p=0,022
Grup 1B-2A	p=0,010	p=0,017	p=0,013	p=1,00	p=0,170
Grup 1B-2B	p=0,003	p=0,005	p=0,003	p=0,067	p=0,047
Grup 1B-3A	p=0,003	p=0,005	p=0,002	p=1,00	p=0,342
Grup 1B-3B	p=0,002	p=0,001	p=0,001	p=0,067	p=0,022
Grup 2A-2B	p=0,374	p=0,374	p=0,796	p=0,067	p=0,342
Grup 2A-3A	p=0,374	p=0,374	p=0,522	p=1,00	p=0,661
Grup 2A-3B	p=0,374	p=1,000	p=0,522	p=0,067	p=0,208
Grup 2B-3A	p=1,000	p=0,081	p=0,661	p=0,067	p=0,185
Grup 2B-3B	p=1,000	p=0,374	p=0,661	p=1,00	p=0,968
Grup 3A-3B	p=1,000	p=0,374	p=1,000	p=0,067	p=0,112



Grafik 4: 6 aylık gruplara ait SVZ'de immunhistokimyasal olarak CD133, Nestin ve GFAP boyanmasının bar diyagram görünümü gösterilmektedir.

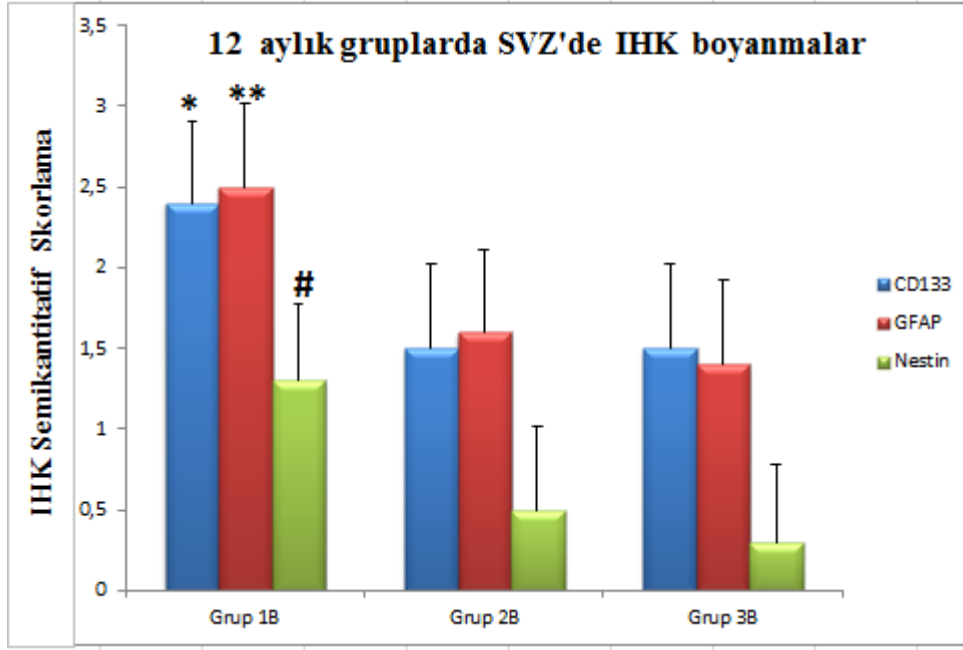
* : CD133 boyanmada Grup 2A ve Grup 3A'ya göre anlamlılık ($p < 0,05$)

** : GFAP boyanmada Grup 2A ve Grup 3A'ya göre anlamlılık ($p < 0,05$)

: Nestin boyanmada Grup 2A ve Grup 3A'ya göre anlamlılık ($p < 0,05$) SVZ: Subventriküler zon, IHK: Immunhistokimya

Subventriküler zondaki GFAP immunhistokimyasal boyama sonuçları değerlendirildiğinde; 6 ve 12 aylık ratlarda, Grup 1'de Grup2 ve Grup3'e göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu belirlendi ($p < 0,05$) (Grafik 4-5, Tablo 6, Resim 10). Her iki yaş grubunda Grup 2 ve Grup 3 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark ($p > 0,05$) saptanmadı. Grup 1A ve Grup 1B arasında GFAP pozitif boyanma açısından istatistiksel olarak anlamlı fark ($p > 0,05$) saptanmadı.

Subventriküler zondaki nestin immunhistokimyasal boyama sonuçları değerlendirildiğinde; 6 ve 12 aylık ratlarda, Grup 1'de Grup2 ve Grup3'e göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptandı ($p < 0,05$) (Grafik 4-5, Tablo 6, Resim 11). Her iki yaş grubunda Grup 2 ve Grup 3 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark ($p > 0,05$) saptanmadı. Grup 1A ve Grup 1B arasında nestin pozitif boyanma açısından istatistiksel olarak anlamlı fark ($p > 0,05$) bulunmadı.



Grafik 5: 12 aylık gruplara ait SVZ'de immunhistokimyasal olarak CD133, Nestin ve GFAP boyanmasının bar diyagram görünümü gösterilmektedir.

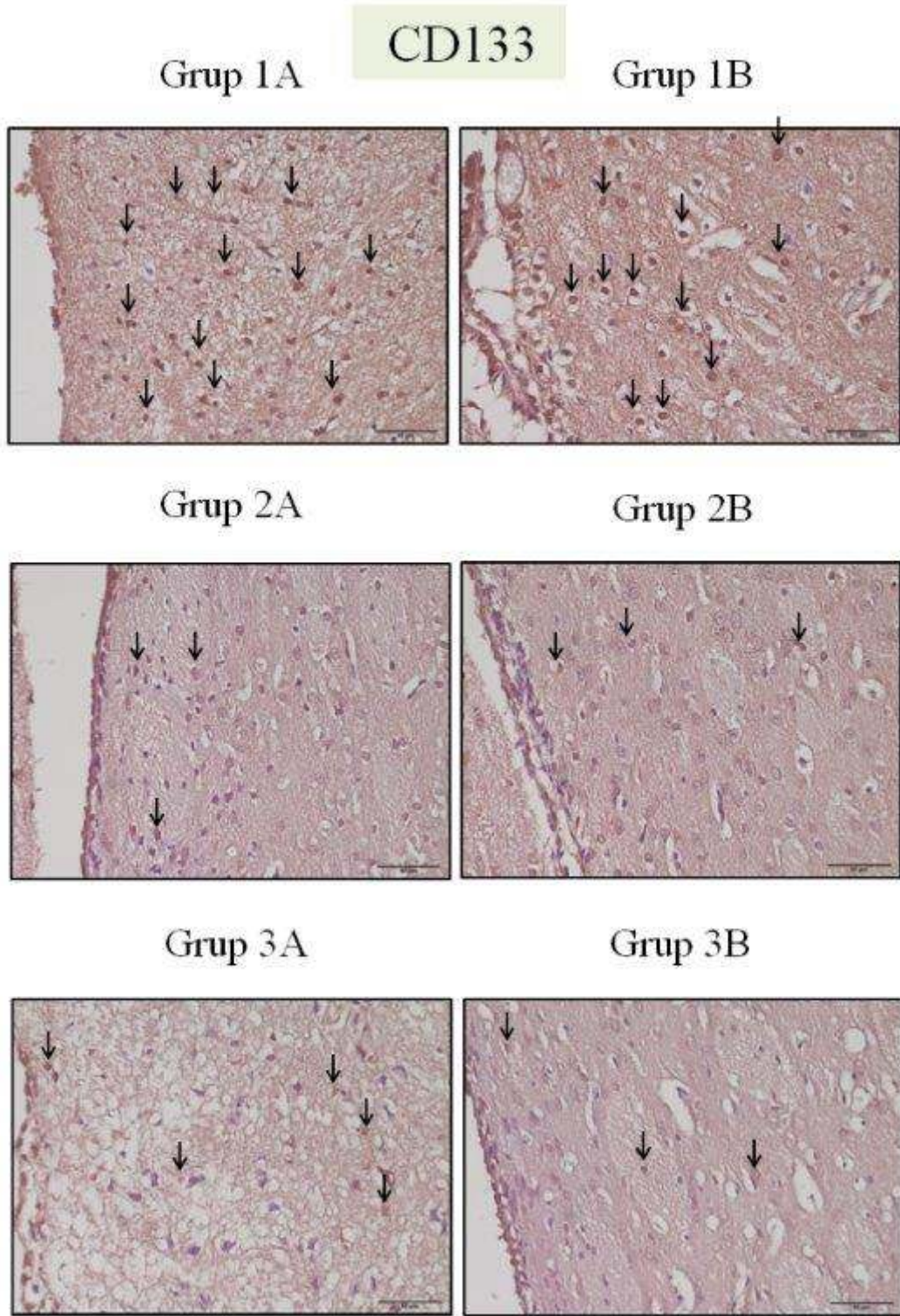
* : CD133 boyanmada Grup 2B ve Grup 3B'ye göre anlamlılık ($p < 0,05$)

** : GFAP boyanmada Grup 2B ve Grup 3B'ye göre anlamlılık ($p < 0,05$)

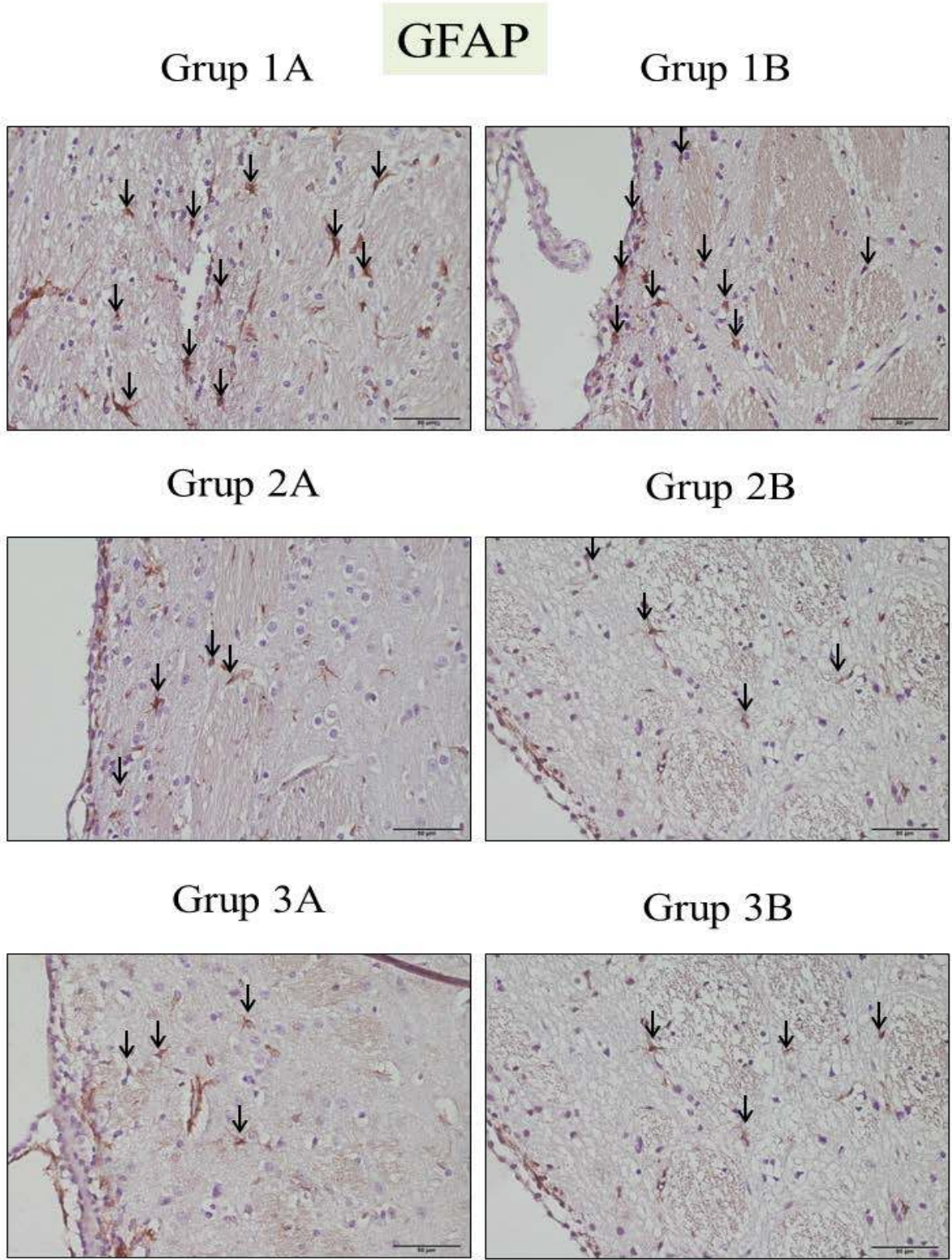
: Nestin boyanmada Grup 2B ve Grup 3B'ye göre anlamlılık ($p < 0,05$)

SVZ: Subventriküler zon, IHK: Immunhistokimya

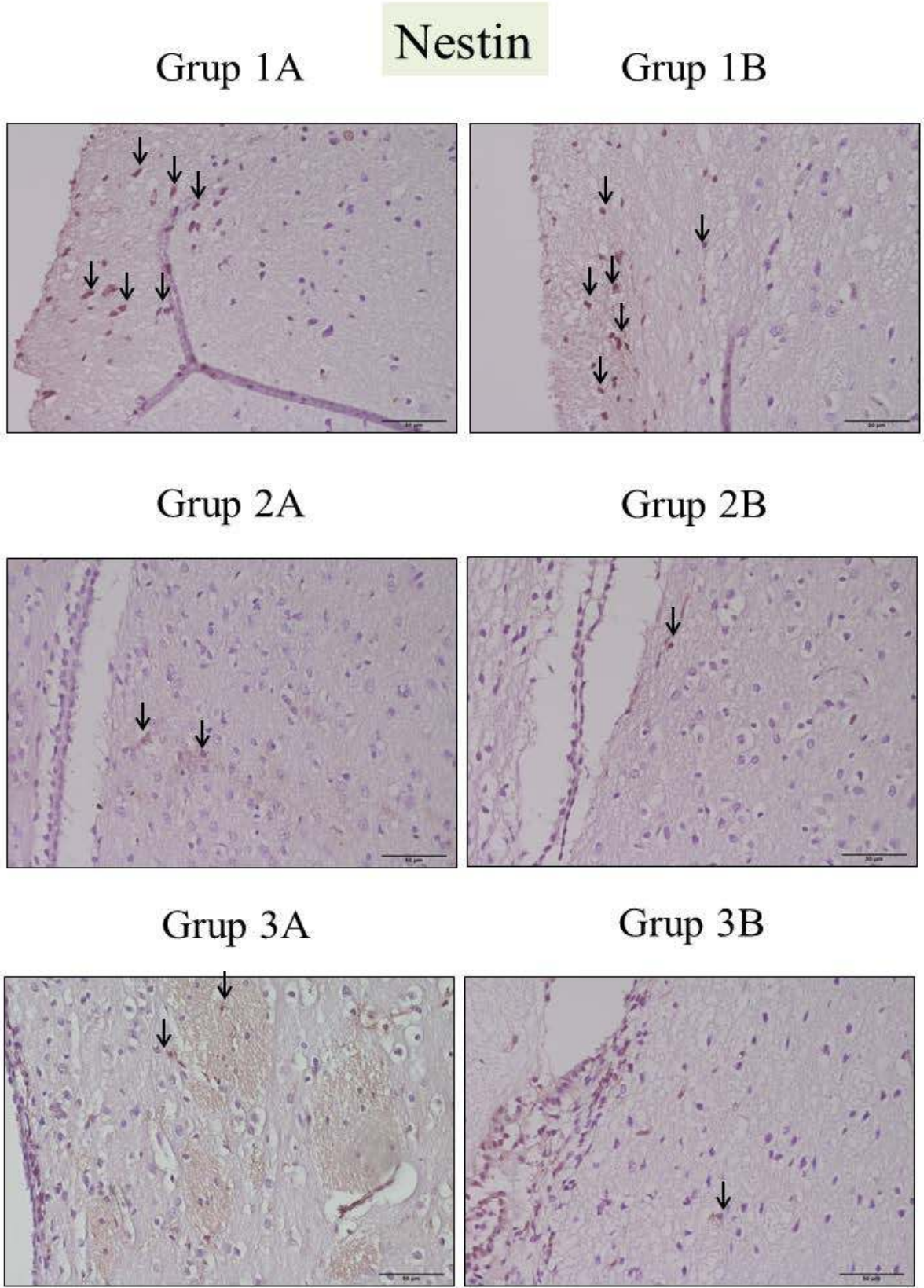
Hipokampusda beta-galaktozidaz immunhistokimyasal boyama sonuçları değerlendirildiğinde, Grup 1A-B, Grup 2A ve Grup 3A'da beta galaktozidaz pozitif hücre saptanmaz iken (Resim 12) hiçbir grupta istatistiksel anlamlılık bulunmadı ($p > 0,05$). SVZ'de beta-galaktozidaz pozitif boyanmada Grup 1B'de Grup 2B ve Grup 3B'ye göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 6, Resim 13). Grup 1A'da beta galaktozidaz boyanma Grup 2A ve Grup 3A ile karşılaştırıldığında daha düşük düzeylerde olduğu fakat farkın anlamlı olmadığı belirlendi ($p > 0,05$) (Tablo-6).



Resim 9: Gruplara ait subventriküler zonda CD133 immün boyanması görülmektedir (x 40 büyütme). Siyah ok: İmmünpozitif hücreler



Resim 10: Gruplara ait subventriküler zonda GFAP immün boyanması görülmektedir (x 40 büyütme). Siyah ok: İmmünpozitif hücreler

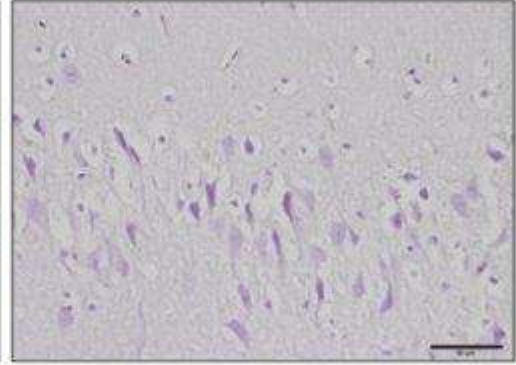
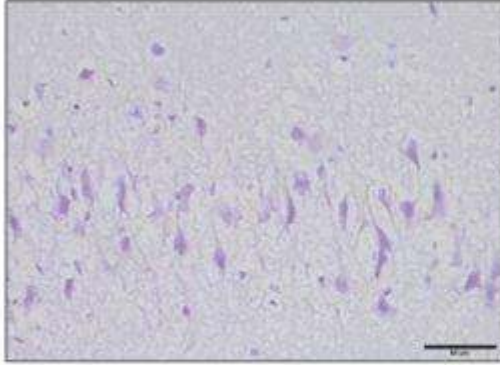


Resim 11: Gruplara ait subventriküler zonda Nestin immün boyanması görülmektedir (x 40 büyütme). Siyah ok: İmmünopozitif hücreler

Beta Galaktosidaz, CA3

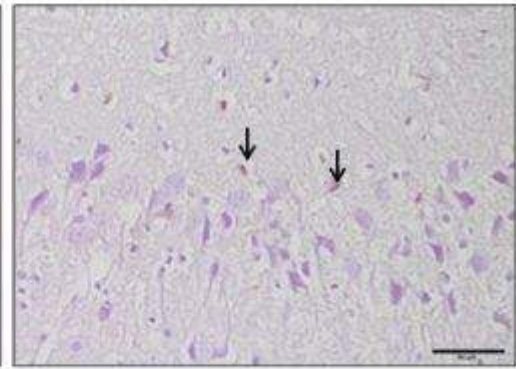
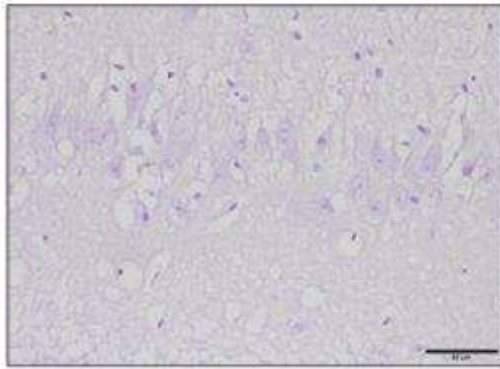
Grup 1A

Grup 1B



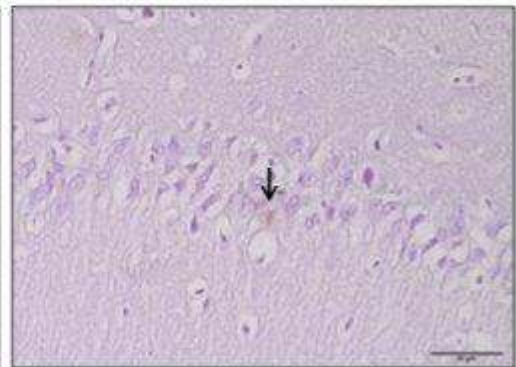
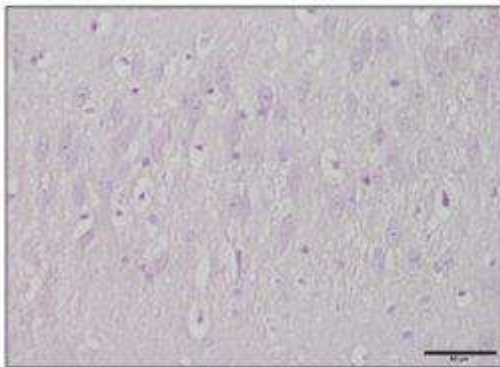
Grup 2A

Grup 2B



Grup 3A

Grup 3B

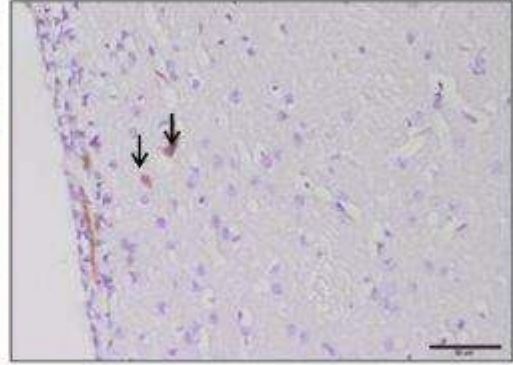
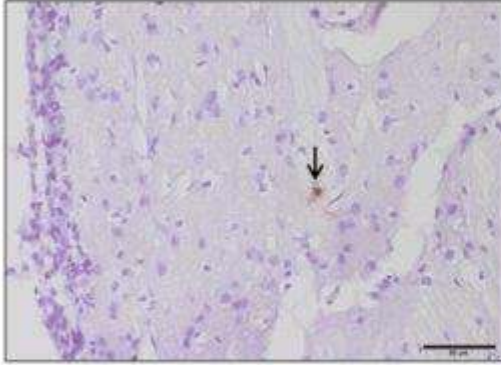


Resim 12: Gruplara ait hipokampusde beta-galaktozidaz immun boyanması görülmektedir (x 40 büyütme). Siyah ok: CA3 bölgesindeki immunpozitif hücreler

Beta Galaktosidaz, SVZ

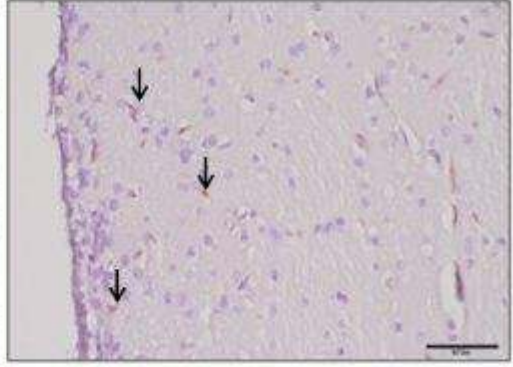
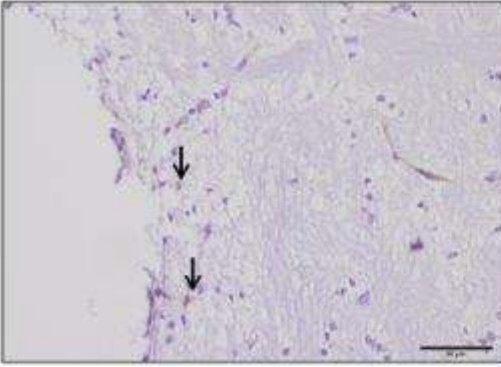
Grup 1A

Grup 1B



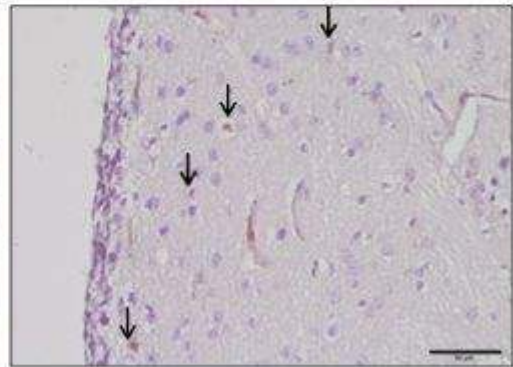
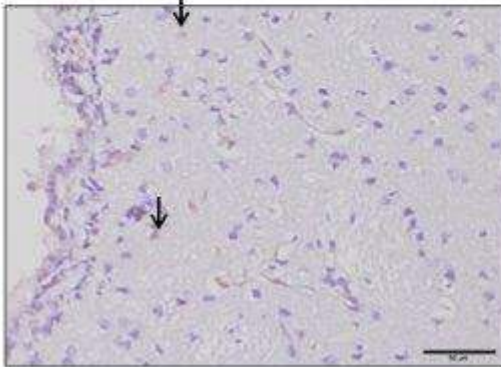
Grup 2A

Grup 2B



Grup 3A

Grup 3B



Resim 13: Gruplara ait subventriküler zonda beta-galaktosidaz immun boyanması gösterilmektedir (x 40 büyütme). Siyah ok: Immunpozitif hücreler

FARMAKOLOJİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

Ratlarda eritrositlerde MDA seviyeleri değerlendirildiğinde CUR uygulanan 12 aylık grupta (Grup 1B) ($0,76 \pm 0,10$) 12 aylık pozitif ve negatif kontrol gruplarına göre [Grup 2B ($1,11 \pm 0,16$), Grup 3B ($1,04 \pm 0,16$)] istatistiksel anlamlı düşüş saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 7-8). Eritrosit GSH-Px aktivitesi değerlendirildiğinde ise Grup 1B’de ($50,64 \pm 9,04$), Grup 2B ($39,70 \pm 2,63$) ve Grup 3B’ye ($39,2 \pm 2,88$) göre istatistiksel anlamlı artış saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 7-8).

Tablo 7: Ratlarda eritrosit ve beyin (sağ hemisfer) MDA, GSH-Px ve SOD enzim aktivite ölçümleri. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir.

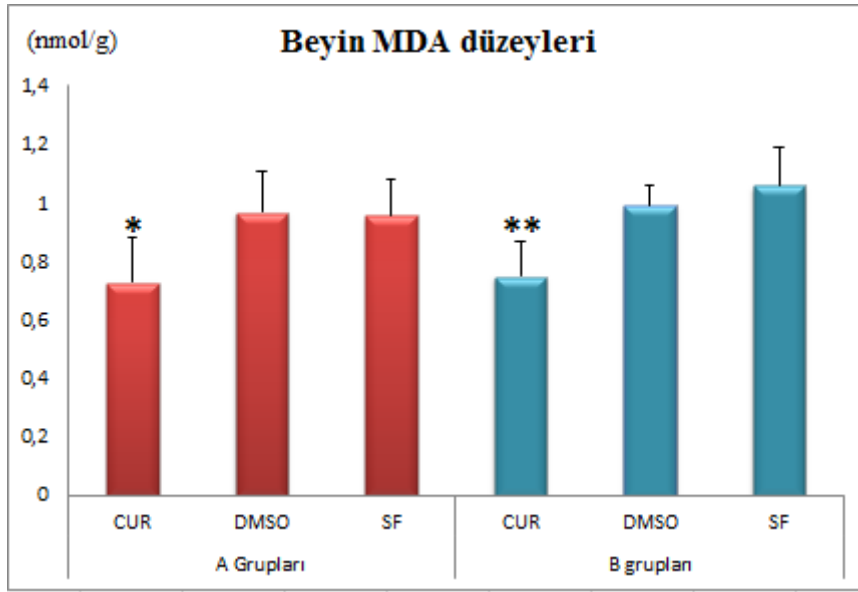
	ERİTROSİT			BEYİN		
	MDA (nmol/ml)	GSH-Px (U/ml)	SOD (U/ml)	MDA (nmol/g)	GSH-Px (U/g)	SOD (U/g)
Grup 1A	$0,86 \pm 0,17$	$42,0 \pm 6,66$	$150,63 \pm 9,07$	$0,73 \pm 0,15$	$72,59 \pm 7,64$	$176,60 \pm 10,55$
Grup 1B	$0,76 \pm 0,10$	$50,64 \pm 9,04$	$146,53 \pm 10,21$	$0,75 \pm 0,12$	$67,84 \pm 8,13$	$164,02 \pm 10,92$
Grup 2A	$1,00 \pm 0,16$	$39,43 \pm 4,26$	$139,14 \pm 13,68$	$0,97 \pm 0,14$	$65,31 \pm 6,51$	$166,29 \pm 8,11$
Grup 2B	$1,11 \pm 0,16$	$39,70 \pm 2,63$	$130,90 \pm 8,07$	$0,99 \pm 0,07$	$60,88 \pm 6,62$	$164,67 \pm 14,44$
Grup 3A	$0,97 \pm 0,16$	$40,92 \pm 2,33$	$142,36 \pm 5,97$	$0,96 \pm 0,12$	$71,83 \pm 4,41$	$164,71 \pm 14,29$
Grup 3B	$1,04 \pm 0,16$	$39,2 \pm 2,88$	$140,07 \pm 12,97$	$1,06 \pm 0,13$	$68,11 \pm 4,30$	$163,21 \pm 12,09$

Tablo 8: Ratlarda eritrosit ve beyin (sağ hemisfer) MDA, GSH-Px ve SOD enzim aktiviteleri

	ERİTROSİT			BEYİN		
	MDA	GSH-Px	SOD	MDA	GSH-Px	SOD
Grup 1A-1B	$p=0,414$	$p=0,088$	$p=0,465$	$p=0,683$	$p=0,222$	$p=0,042$
Grup 1A-2A	$p=0,105$	$p=0,563$	$p=0,105$	$p=0,017$	$p=0,064$	$p=0,049$
Grup 1A-2B	$p=0,020$	$p=0,728$	$p=0,005$	$p=0,005$	$p=0,011$	$p=0,105$
Grup 1A-3A	$p=0,201$	$p=0,949$	$p=0,142$	$p=0,018$	$p=0,848$	$p=0,224$
Grup 1A-3B	$p=0,064$	$p=0,643$	$p=0,105$	$p=0,004$	$p=0,297$	$p=0,064$
Grup 1B-2A	$p=0,013$	$p=0,019$	$p=0,306$	$p=0,027$	$p=0,241$	$p=0,660$
Grup 1B-2B	$p=0,007$	$p=0,019$	$p=0,016$	$p=0,005$	$p=0,241$	$p=0,769$
Grup 1B-3A	$p=0,042$	$p=0,019$	$p=0,570$	$p=0,018$	$p=0,371$	$p=0,807$
Grup 1B-3B	$p=0,013$	$p=0,008$	$p=0,380$	$p=0,004$	$p=0,769$	$p=0,883$
Grup 2A-2B	$p=0,128$	$p=0,958$	$p=0,189$	$p=1,000$	$p=0,400$	$p=0,752$
Grup 2A-3A	$p=0,602$	$p=0,728$	$p=0,418$	$p=0,817$	$p=0,049$	$p=0,643$
Grup 2A-3B	$p=0,635$	$p=0,529$	$p=1,000$	$p=0,343$	$p=0,247$	$p=0,400$
Grup 2B-3A	$p=0,147$	$p=0,563$	$p=0,011$	$p=0,598$	$p=0,008$	$p=0,908$
Grup 2B-3B	$p=0,318$	$p=0,713$	$p=0,141$	$p=0,365$	$p=0,021$	$p=0,916$
Grup 3A-3B	$p=0,384$	$p=0,385$	$p=0,487$	$p=0,181$	$p=0,164$	$p=0,908$

* İkili gruplar arasındaki anlamlılıklar; Mann Whitney U testi ile belirlendi.

Rat beyin hücrelerinde yapılan MDA analizleri değerlendirildiğinde 6 ve 12 aylık ratlarda Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 3 (aynı yaş grubu birbirleri arasında) karşılaştırıldığında Grup 1’de beyin MDA seviyelerinde diğer gruplara göre istatistiksel anlamlı düşüş saptandı ($p<0,05$) (Tablo 7-8) (Grafik 6). Beyin MDA seviyeleri açısından tüm gruplar için A-B alt grupları kendi aralarında (1A ile 1B, 2A ile 2B, 3A ile 3B) karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunmadı ($p>0,05$). Grup 2A ile Grup 3A ve Grup 2B ile Grup 3B arasında beyin MDA seviyelerinde istatistiksel anlamlılık bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 7-8).



Grafik 6: Tüm gruplarda beyin MDA düzeyleri gösterilmiştir.

*: A gruplarında; CUR verilen grup ile DMSO ve SF verilen grup arasındaki istatistiksel anlamlılık ($p<0,05$)

**: B gruplarında; CUR verilen grup ile DMSO ve SF verilen grup arasındaki istatistiksel anlamlılık ($p<0,05$)

Grup 3A’daki beyin GSH-Px aktiviteleri Grup 2A ile kıyaslandığında daha yüksek düzeylerde olduğu ve farkın anlamlı olduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 7-8). Grup 3B’deki beyin GSH-Px aktiviteleri Grup 2B ile kıyaslandığında daha yüksek düzeylerde olduğu ve farkın anlamlı olduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 7-8). Beyin GSH-Px aktiviteleri açısından tüm gruplar için A-B alt grupları kendi aralarında (1A ile 1B, 2A ile 2B, 3A ile 3B) karşılaştırıldığında enzim aktivitelerinde A gruplarında B gruplarına göre yüksekliğin istatistiksel

bir anlamlılığı bulunmadı ($p>0,05$). Grup 1A'da beyin GSH-Px aktiviteleri Grup 2A ve Grup 3A'ya göre yüksekliğin istatistiksel bir anlamlılığı bulunmadı ($p>0,05$).

Grup 1A'daki beyin SOD aktivitesinin Grup 2A'ya göre yüksekliğı istatistiksel olarak anlamlılık gösterirken ($p<0,05$), Grup 3A'ya göre istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktaydı (Tablo 7-8). Grup 1B ile Grup 2B ve Grup 3B arasında beyin SOD aktivitesi açısından herhangi bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 7-8). Grup 2 ve Grup 3 beyin SOD aktiviteleri açısından A-B alt grupları kendi aralarında (2A ile 2B, 3A ile 3B) karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 7-8). Grup 2A ile Grup 3A ve Grup 2B ile Grup 3B arasında beyin SOD seviyelerinde istatistiksel anlamlılık saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 7-8).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Canlılarda yaşlanma ilerleyici ve geri dönüşümsüz bir süreç (195) olarak kabul edilmektedir. İlerleyen yaşla gelişen nörodejeneratif süreçten etkilenen önemli beyin bölgelerinden biri de hipokampustur (30). Hipokampusun nöroplastisite açısından da önemli olması nedeniyle yaşlılık sürecinden hipokampusun nasıl etkilendiği ve bu değişikliklerin yavaşlatılması konusunda çabaların artmasına neden olmaktadır.

Yaş ile beyinde oksidatif stresin artması, oksidatif stres aracılı protein agregasyonu ve yaşlanmayla ilişkili nörodejeneratif hastalıklardaki nöronal ölümlerin başlıca sebebidir (99, 107-109). Erişkin nöroenezin en önemli bölgelerinden biri olan SVZ'den izole edilen kök hücrelerin, epidermal growth factor (EGF) veya fibroblast growth factor (FGF) eklenen kültür ortamlarında çoğalabildiğini gösteren çalışmalar, bu hücrelerin çeşitli santral sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde yeni açılımlar sağlayabileceğini düşündürmektedir (47-49). Nöroenezde yaşa bağlı düşüş nedenlerinden biri olarak kabul edilen nöral progenitör hücre senesensi (62) olması nedeniyle senesensin önemli tetikleyicilerinden biri olan oksidatif stresin engellenmesine yönelik tedavi girişimleri günümüzde oldukça popülerlik kazanmıştır.

Sofistike tedavilerin yanısıra geleneksel ürünlerin kullanımı üzerinde de çalışmalar söz konusudur. Hindistan'da CUR içeren körinin yaygın olarak kullanılması ve ABD'deki AH başta olmak üzere nörodejeneratif hastalıkların görülme oranının Hindistan'dakine göre 4,4 kat daha fazla (150, 196) olması nedeniyle bu konudaki araştırmaların ilgi odağı CUR üzerine yoğunlaşmıştır. Antioksidan ve antiinflamatuvar bir ajan olan CUR'nin hücre kültüründe bifazik etki ile embriyonik nöroprogenitör hücre proliferasyonunu düzenlediği ve CUR uygulamasının fare beyinde hipokampusta SGZ bölgesinde nöroprogenitör hücre artışa sebep olduğu gösterilmiştir (64). CUR'nin antioksidan özellikleri ile yaşlanmanın başlıca nedenleri arasında yer alan oksidatif strese karşı koyduğu düşünülürse CUR'nin bu etkilerinden dolayı selüler senesensin yanısıra yaşla ilişkili birçok hastalığın başlangıç veya progresyonunu yavaşlatma veya geciktirmede olası bir araç olarak kullanılabileceği kabul edilebilir.

Literatür incelendiğinde CUR ve nöroproteksiyon veya nörosenesens çalışmalarının tamamının akselere senesens modellerinde yapılmış olduğu görülmektedir (172, 173, 197-199). Bu noktadan hareketle çalışmamız akselere senesens modeli geliştirilmeksizin normal yaşlanma sürecinde CUR'nin hipokampal hücrelerin ve beyindeki kök hücrelerin senesense

gidiş üzerindeki olası önleyici etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle araştırmamız in vivo ortamda normal yaşlanma sürecinde CUR senesens ilişkisini araştıran ilk çalışmalardan biri olması açısından önem arz etmektedir.

Yaşa bağlı gelişen beyin ağırlık ve hacim azalmasının önemli nedeninin nöron sayısının azalması olduğu bilinmektedir (200). Yaşla birlikte dentat gyrusta da granül hücre sayısında azalma saptanmıştır (201, 202). Ratlarda beyin farklı bölgelerindeki (korteks, hipokampus, serebellum, olfaktör bulbus) total nöron ve nöron dışı hücre sayısında adölesan dönemde önemli artış olduğu, yaygın nöron kaybı eğiliminin 3 aylık dönemde başlayıp 12-22 aylık döneme kadar belirgin hale geldiği bildirilmiştir (203). Çalışmamızda ise yaşla birlikte hipokampal nöron sayısında anlamlı değişiklik saptanmadı. Bu durum yeterince yaşlı denek ile çalışılmamış olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Rat beyininde hipokampal SA-beta-Gal ekspresyonu yaşlanmakla artar. Yapılan bir çalışmada CA3 piramidal hücrelerinde SA-beta-Gal aktivitesi 18 ve 24 aylık ratlarda arttığı gösterilmiş, gyrus dentatus'ta ise SA-beta-Gal eksprese eden nöron saptanmadığı bildirilmiştir (204). Bu verilere paralel olarak bizim çalışmamızda daha yaşlı ratlarda hipokampal SA-beta-Gal eksprese eden hücreler sadece CA3 bölgesinde saptanmakla birlikte istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

Yapılan çalışmalarda CUR tedavisinin kronik stres altındaki ratlarda hipokampal nörojenezi arttırdığı (197) ve homosistein ile indüklenen serebral hasarlanma modelinde hipokampal MDA ve $O_2^{\cdot-}$ seviyelerini azaltarak GD'de hücre yoğunluğunu arttırdığı bildirilmiştir (198). CUR'nin kainik asite bağlı hipokampal hücre ölümünü azaltarak hipokampal nöron sayısını arttırdığı saptanmıştır (172). D-galaktozla indüklenen senesens rat modelinde CUR ve piperin tedavilerinin sinerjik etki ile nöronal senesensi azalttığı ortaya koyulmuş ve CUR monoterapisinin CA1 nöron sayısında artış sağladığı bildirilmiştir (199). Bu çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda hızlandırılmış (akselere) senesens sürecindeki ratlar kullanılmadı, yaşamsal döngüyle daha uyumlu olacağı düşünülerek doğal yaşlanma sürecindeki ratlar kullanıldı. Bu nedenle çalışmamızın kurgusu bu çalışmalardan farklıdır. Bu çalışmalara paralel olarak çalışmamızda CUR verilen gruplarda hipokampal nöron sayısında anlamlı artış saptandı. Yapılan çalışmalarda hipokampal nöron sayısındaki artış CA1 ve GD bölgelerinde ortaya koyulmuş (198, 199) iken çalışmamızda CA3 ve GD'de nöron sayısında anlamlı artış saptandı.

Literatürde yaşla ilişkili değişiklikler SVZ ve SGZ bölgelerinin her ikisinde de gözlemlendiği ve yaşlanma ile beyinde nörogenezde azalma olduğu bildirilmiştir (52, 53, 205). Oksidatif stresin nörogenezi olumsuz yönde etkilemesi nedeniyle antioksidan aktivite artışının in vitro ortamda nöroprogenitör hücreleri koruduğu ve in vivo ortamda nöroproteksiyon sağlayan hücresel ağ oluşumunu güçlendirdiği bildirilmiştir (66, 67). Güçlü bir antioksidan olarak CUR bu nedenle üzerinde yoğun olarak çalışılan bir moleküldür. Kang ve arkadaşları (206) CUR'nin in vitro koşullarda beyin kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklediğini ve beyinde erişkin nöral kök hücrelerinde nörogenez, sinaptogenez ve nöral progenitor hücre göçünü indüklediğini göstermişlerdir. Deneysel ortamda yapılan çalışmalarda da CUR uygulamasının fare beyinde hipokampusta SGZ bölgesinde nöroprogenitör hücre artışına sebep olduğu saptanmıştır (64). CUR uygulamasının yetişkin farelerde GD ve SVZ'de nöroprogenitör hücre ve hipokampal nörogenezi arttırdığı gösterilmiştir (64). Bu çalışmalara paralel olarak bizim çalışmamızda da CUR uygulanan gruplarda SVZ'de NKH sayısında diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı artış saptanmıştır.

Literatürde, SVZ'de NKH'nin senesense gidişini inceleyen çalışmalar sınırlı sayıdadır. SVZ'de yaşa bağlı nörogenezdeki azalmanın in vivo ve in vitro senesens belirteç gen ekspresyon artışı ve in vitro replikatif senesens artışı aracılığıyla geliştiği saptanmıştır (68). İlerleyen yaş ile NKH'nin senesense gidişine bağlı olarak yaşa bağlı hipokampal nörogenezde azalma olduğu ileri sürülmektedir (68). Çalışmamızda hipokampal nöronlarda SA-B-Gal pozitifliği anlamlı olarak ortaya koyulamaz iken SVZ'de NKH'de SA-B-Gal pozitif senesent hücrelerinde CUR verilen 12 aylık ratlarda diğer 12 aylık gruplara göre anlamlı azalma olduğu saptandı.

SOD, GSH-Px ve glutatyon-S transferaz gibi antioksidan enzimatik sistemlerin ve glutatyon gibi nonenzimatik sistemlerin yaşlanma ile bozulduğu ve CUR takviyesi ile antioksidan seviyelerinin ve aktivitelerinin doza bağımlı bir şekilde korteks, hipokampus, serebellum ve medulla gibi beyin farklı bölgelerinde düzeldiği bilinmektedir (207-209). Bala ve arkadaşları (208) ile Belviranlı ve arkadaşları (210) ratlarda normal yaşlılık sürecinde CUR tedavisi ile beyin MDA seviyelerinde düşüş saptamıştır. Bu çalışmalara paralel olarak çalışmamızda lipid peroksidasyonunun önemli göstergelerinden biri olan MDA'nın beyindeki seviyelerinin CUR tedavisi verilen her iki yaş grubunda da diğer gruplara göre anlamlı düşüş gösterdiği saptandı. CUR tedavisi ile beyin MDA seviyelerindeki azalma deneysel AH

modellerinde de (211, 212) bildirilmiştir. Çalışmamızda CUR tedavisinin beyin GSH-Px ve SOD seviyelerine etkisi saptanmadı. Benzer şekilde Belviranlı ve arkadaşlarının (210) yaptığı çalışmada da CUR tedavisi ile beyin GSH-Px seviyelerinde değişiklik saptanmamıştır. Deneysel AH modellerinde ise CUR tedavisi ile beyin GSH-Px seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir (211, 212). Beyin GSH-Px değişikliğinin bulunmamasının sebebi CUR'nin dozaj, tedavi süresi, ratların yaşlarına bağlı olabilir. Son dönemde yapılan bazı çalışmalarda oksidatif stresin tetiklendiği rat modellerinde (213-215) CUR tedavisi ile eritrosit MDA seviyelerinde düşüş ve GSH-Px seviyelerinde artış bildirilmiştir. Bu sonuçlara paralel olarak çalışmamızda CUR verilen 12 aylık grupta eritrosit MDA seviyelerinin anlamlı azaldığı ve eritrosit GSH-Px seviyelerinin anlamlı olarak artmış olduğu bulunduğunu saptadık.

Woolley ve Mc Ewen östrojenin nöronal eksitator sinaptik input gücünü etkileyerek hipokampal CA1 piramidal sinaps yoğunluk artışı ile ilişkisini göstermiştir (216). Östrojenin çalışma sonuçlarına olası negatif etkileri öngürülerek çalışmamızda denekler erkek cinsiyetinde seçildi.

Gerek Frautschy'nin (217) çalışmasında gerekse diğer transgenik modellerde CUR'nin uygulama şekli, hayvanların günlük gıdalarına karıştırma yoluyla. Bu yolla hayvanlar tarafından alınan ilaç miktarının standardizasyonu pek mümkün görünmemektedir (150). Bu nedenle çalışmamızda CUR, sabit dozda ve günlük olarak intraperitoneal (IP) olarak uygulandı. Daha önce yapılan CUR-nöroproteksiyon rat çalışmalarında (163, 174) da CUR'nin IP yolla verildiği görülmektedir. CUR'nin oral biyoyararlanımının oldukça düşük olması, doğal olarak oral alınan dozun yüksek olmasına neden olacaktır. Halbuki nöroproteksiyon için gerekli CUR dozu, alınan oral dozun çok çok altındadır. Bu nedenle de CUR'nin IP olarak uygulanması çalışmamızın diğer önemli yönüdür.

CUR, 300 mg/kg 'lık günlük dozlarda streptozosin uygulanan ratlarda bellek kaybında iyileşme sağladığı (174) ve fokal serebral iskemi rat modelinde nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir (163, 218). Bu nedenle çalışmamızda da CUR intraperitoneal yolla 300mg/kg olarak günlük dozlarda verildi.

Çalışmamızın bazı yönleriyle geliştirilmesi gerekmektedir. Özellikle senesens hücrelerinin hipokampusta gruplar arasında karşılaştırma yapılamayacak kadar az sayıda varlığının gösterilmesi hayvanların yeterince yaşlı olmamasından kaynaklanabilir. Daha yaşlı gruplarda (B grupları) hayvan yaşının 12 aylık olması ve hayvan sayısının az olması bu çalışmadaki eksik yönlerdir. Deney sırasında gelişen hayvan ölümleri en fazla CUR grubunda

gözlemlendi ve en sık ölüm nedeni peritonit olarak saptandı. Sakrifikasyon aşamasında CUR grubunda bazı deneklerde periton inflamasyon bulguları ve visseral peritonda CUR kalıntıları gözlemlendi. Bu durum CUR için çözücü olarak kullanılan DMSO'nun CUR yüksek miktarlarında in vivo ortamda molekülü yeterince taşıyamamasından ve emilim bozukluğuna bağlı periton içi birikimlerin gerçekleşmesinden sorumlu olabilir. Bu durumu aydınlatmak amacıyla CUR'nin farklı çözücüler kullanılarak uygulamasının yapılacağı çalışmalar planlanmalıdır.

Sonuç olarak CUR tedavisinin yaşlılık sürecinde beyin MDA seviyelerini azaltarak hipokampal nöronların senesense gidişini yavaşlatabileceği ve SVZ'de NKH senesensini yavaşlatarak NKH sayısını artırma konusunda etkili olabileceği gösterilmiştir. Bu veriler ışığında CUR, ilerleyen yaşla ortaya çıkan kognitif yaşlanma ve ilişkili olarak nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi için umut verici bir yaklaşım olabilir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, daha fazla sayıda denekler üzerinde prelinik çalışmalarla ve randomize kontrollü insan çalışmalarıyla CUR'nin etkinliğinin ortaya konulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Cassel KC. Geriatric Medicine. Molecular and Biologic Factors in Aging. 4th ed. New York: Springer; 2003.
2. Bozcuk A, Demirsoy A. Geriatri 1. In: Gökçe Kutsal Y, Çakmakcı M, Ünal S, editors. Yaşlanmanın biyolojisi. Ankara: Hekimler Yayın Birliği, Medico Graphics Ajans ve Matbaası; 1997. p. 5-6.
3. Finch C. Longevity, senescence, and the genome. Chicago and London: The University of Chicago Press; 1990.
4. Işık AT, Bozoğlu E. Bilişsel (kognitif) yaşlanma. Geriatri Pratiğinde Demans Sendromu İstanbul: Som Kitap; 2009. p. 21-30.
5. United Nations, Population, Division. Department of Economic and Social Affairs, Aging: <http://www.who.int/whosis>.
6. Başbakanlık, Devlet, İstatistik, Enstitüsü, Başkanlığı. [http:// www.die.gov.tr](http://www.die.gov.tr).
7. Green RC. Alzheimer's disease and other dementing disorders in adults. Clinical Neurology. Philadelphia: Lippincot-Raven; 1995. p. 1-83.
8. Afifi A, Bergman R. Functional Neuroanatomy Text and Atlas. 2th ed. New York: Lange Medical Books-McGraw Hill; 2005.
9. <http://en.wikipedia.org>.
10. Arifoğlu Y. Öğrenme ve Belleğin Nöroanatomisi. In: Işık A, editor. Her Yönüyle Alzheimer Hastalığı. İstanbul: Som Kitap; 2012. p. 15-80.
11. Stephen S. Sternberg MD. Histology for pathologists. Lippincott. Philedelphia-New York: Raven Publishers; 1995. p. 248.
12. Berry M, Bannister L, Standring S. Gray's Anatomy. 38th ed. Williams P, Bannister L, Berry M, Collins P, Dyson M, Dussek J, et al., editors. New York: Churchill Livingstone; 1995. 1124 p.
13. İkinci A. Beyin İskemisi Sonrasında Uygulanan Etil Piruvatın Sıçan Hipokampusunun Nöron Sayısı Üzerine Etkisi: Histoloji Ve Embriyoloji Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniv.Sağlık Bilimleri Enst.: Trabzon; 2011.
14. Meydan S. Testosteron hormonu uygulanan sıçanlarda hipokampus morfolojik yapısının immunohistokimyasal olarak incelenmesi ,Uzmanlık tezi. Fırat Üniv., Sağlık Bilimleri Enst.: Elazığ; 2008.

15. Duvernoy HM. The human hippocampus: Functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI. Third ed: Springer; 2005.
16. Andersen P. The hippocampus book. New York: Oxford University Press; 2007.
17. Seress L. Interspecies comparison of the hippocampal formation shows increased emphasis on the regio superior in the Ammon's horn of the human brain. *J Hirnforsch.* 1988;29(3):335-40.
18. Bayer S, Altman J. Hippocampal development in the rat: Cytogenesis and morphogenesis examined with autoradiography and low-level X-irradiation. *J Comp Neurol* 1974;158:55-80.
19. Douglas R, Peterson J, Douglas D. The ontogeny of a hippocampus-dependent response in two rodent species. *Behav Biol.* 1973;8(1):27-37.
20. Eichenbaum H, Cohen, NJ. . From Conditioning to Conscious Recollection: Memory Systems of the Brain. Oxford: Oxford University Pres; 2001.
21. O'Keefe J, Nadel L. The Hippocampus as a Cognitive Map. Oxford: Clarendon Pres; 1978.
22. O'Mara S. The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *JAnat.* 2005;207(3):271-82.
23. Witter MaAD. The Rat Nervous System. In: G P, editor. Hippocampal Formation. Third ed. China: Elsevier; 2004. p. 635-704.
24. T. U. Depresyon ve Nöroplastisite. Ankara: Çizgi Yayınları; 2005.
25. Bakırcı S. Deneysel Sepsis Oluşturulan Erişkin Sıçanların Beyinlerinde Nöroenezin İncelenmesi: Uzmanlık Tezi. Bursa: Uludağ Üniv. Tıp Fak. Anatomi ABD; 2009.
26. Warner-Schmidt JL, Duman RS. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus.* 2006;16(3):239-49.
27. Terry RD, Deteresa R, Hansen LA. Neocortical Cell Counts in Normal Human Adult Aging. *Ann Neurol.* 1987;21(6):530-9.
28. Ball MJ. Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study. *Acta neuropathologica.* 1977;37(2):111-8.
29. Esri MM HB, Beyreuther K et al. Ageing and demantias. Greenfield's Neuropathology. New York: Oxford University Press; 1977.

30. Issa AM, Rowe W, Gauthier S, Meaney MJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1990;10(10):3247-54.
31. Meaney MJ, Aitken DH, van Berkel C, Bhatnagar S, Sapolsky RM. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science*. 1988;239(4841 Pt 1):766-8.
32. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *The New England journal of medicine*. 2005;353(8):811-22.
33. Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*. 1999;286(5439):548-52.
34. Gould E, Vail N, Wagers M, Gross C. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98:10910-7.
35. Conover JC, Shook BA. Aging of the Subventricular Zone Neural Stem Cell Niche. *Aging and Disease*. 2011;2(1):49-63.
36. Seaberg RM, van der Kooy D. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(5):1784-93.
37. McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*. 1997;276(5309):66-71.
38. Olson AK, Eadie BD, Ernst C, Christie BR. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus*. 2006;16(3):250-60.
39. Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, Eriksson PS. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2005;36(6):1278-82.
40. Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature*. 2001;411(6833):42-3.
41. Doetsch F, Alvarez-Buylla A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(25):14895-900.
42. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(6):425-36.

43. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17(13):5046-61.
44. Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 1994;264(5162):1145-8.
45. Kornack DR, Rakic P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(8):4752-7.
46. Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Experimental neurology*. 2001;172(1):1-16.
47. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000;287(5457):1433-8.
48. Doetsch F, Caille I, Lim Dea. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian. *Brain Cell*. 1999;97:1-20.
49. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(3):629-34.
50. Bakırcı S. Deneysel sepsis oluşturulan erişkin sıçanların beyinlerinde nörogenezin incelenmesi. *Tıpta Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniv Tıp Fak.* Bursa 2009.
51. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2:287-93.
52. Zitnik G, Martin GM. Age-related decline in neurogenesis: old cells or old environment? *Journal of neuroscience research*. 2002;70(3):258-63.
53. Drapeau E, Nora Abrous D. Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging cell*. 2008;7(4):569-89.
54. Escames G, Lopez A, Garcia JA, Garcia L, Acuna-Castroviejo D, Garcia JJ, et al. The role of mitochondria in brain aging and the effects of melatonin. *Current neuropharmacology*. 2010;8(3):182-93.
55. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*. 2005;309(5733):481-4.

56. Tropepe V, Craig C, Morshead C, Van der K. Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17:7850-9.
57. Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(38):8354-65.
58. Shetty AK, Hattiangady B, Shetty GA. Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. *Glia*. 2005;51(3):173-86.
59. Cameron HA, McKay RD. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nature neuroscience*. 1999;2(10):894-7.
60. Montaron M, Petry K, Rodriguez J, Marinelli M, Aurousseau C, Rougon G, et al. Adrenalectomy increases neurogenesis but not PSA-NCAM expression in aged dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 1999;11:1479-85.
61. Montaron MF, Drapeau E, Dupret D, Kitchener P, Aurousseau C, Le Moal M, et al. Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory. *Neurobiology of aging*. 2006;27(4):645-54.
62. Molofsky AV, Slutsky SG, Joseph NM, He S, Pardal R, Krishnamurthy J, et al. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*. 2006;443(7110):448-52.
63. Nicolle MM, Gonzalez J, Sugaya K, Baskerville KA, Bryan D, Lund K, et al. Signatures of hippocampal oxidative stress in aged spatial learning-impaired rodents. *Neuroscience*. 2001;107(3):415-31.
64. Kim SJ, Son TG, Park HR, Park M, Kim MS, Kim HS, et al. Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(21):14497-505.
65. French HM, Reid M, Mamontov P, Simmons RA, Grinspan JB. Oxidative stress disrupts oligodendrocyte maturation. *Journal of neuroscience research*. 2009;87(14):3076-87.
66. Sharma RK, Zhou Q, Netland PA. Effect of oxidative preconditioning on neural progenitor cells. *Brain research*. 2008;1243:19-26.

67. Madhavan L, Ourednik V, Ourednik J. Neural stem/progenitor cells initiate the formation of cellular networks that provide neuroprotection by growth factor-modulated antioxidant expression. *Stem Cells*. 2008;26(1):254-65.
68. Ahlenius H, Visan V, Kokaia M, Lindvall O, Kokaia Z. Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(14):4408-19.
69. Karasu C. Biyolojik Yaşlanma Teorileri: Oksidatif Stresin Rolü. *Türkiye Klinikleri, J Med Sci*. 2008;28(6):1-11.
70. Campisi J. Cellular Senescence and Cell Death. *Physiological Basis of Aging and Geriatrics*. 3rd ed. Florida: CRC Press; 2003.
71. Jazwinski SM. Aging and longevity genes. *Acta biochimica Polonica*. 2000;47(2):269-79.
72. Yüzüak H. Yaşlanma Sürecinde Pankreas Dokusunda Nox, Mda, Gsh Düzeyleri Ve Melatoninin Etkisi: Fizyoloji Yüksek Lisans Tezi Gazi Üniv. SBE.: Ankara; 2008.
73. Walker RF. Is aging a disease? *Aging Male* 2002;5:147–69.
74. Armandola E. Time and the biology of aging. *MedGenMed : Medscape general medicine*. 2005;7(1):24.
75. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*. 1961;25:585-621.
76. Golubev A, Khrustalev S, Butov A. An in silico investigation into the causes of telomere length heterogeneity and its implications for the Hayflick limit. *J Theor Biol*. 2003;225:153-70.
77. Chen J, Patschan S, Goligorsky MS. Stress-induced premature senescence of endothelial cells. *Journal of nephrology*. 2008;21(3):337-44.
78. Campisi J, Fagagn F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:729-40.
79. Dimri G, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92:9363–7.

80. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky J, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated b-galactosidase (SA-bgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009;4:1798–806.
81. Lee B, Han J, Im J, Morrone A, Johung K, Goodwin E, et al. Senescence-associated b-galactosidase is lysosomal b-galactosidase. *Aging cell.* 2006;5:187–95.
82. Kurz D, Decary S, Hong Y, Erusalimsky J. Senescence-associated b-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 2000;113:3613–22.
83. Yang NC, Hu ML. The limitations and validities of senescence associated-b-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp Gerontol.* 2005;40:813-9.
84. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 1998;279(5349):349-52.
85. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990;345(6274):458-60.
86. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994;266(5193):2011-5.
87. Lansdorp PM. Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence. *Mechanisms of ageing and development.* 2000;118(1-2):23-34.
88. Martens UM, Chavez EA, Poon SS, Schmoor C, Lansdorp PM. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Experimental cell research.* 2000;256(1):291-9.
89. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995;92(10):4337-41.
90. Fripiat C, Chen QM, Zdanov S, Magalhaes JP, Remacle J, Toussaint O. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(4):2531-7.

91. Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*. 1998;16(9):1113-23.
92. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997;88(5):593-602.
93. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes & development*. 1998;12(19):2997-3007.
94. Zou H, Stoppani E, Volonte D, Galbiati F. Caveolin-1, cellular senescence and age-related diseases. *Mechanisms of ageing and development*. 2011;132(11-12):533-42.
95. Hayflick L. Cell biology of aging. *Federation proceedings*. 1979;38(5):1847-50.
96. Hemann M, Strong M, Hao L, Greider C. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*. 2001;107:67-77.
97. Ergün MA. Replikatif Yaşlanma, Hücresel Senesens ve Apoptozis: Sonuçları ve Hastalıklardaki Önemi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2008;28:21-6.
98. Vicencio J, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path-a minireview. *Gerontology*. 2008;54:92-9.
99. Gilca M, Stoian I, Atanasiu V, Virgolici B. The oxidative hypothesis of senescence. *J Postgrad Med*. 2007;53:207-13.
100. Rattan SI. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals. *Free radical research*. 2006;40(12):1230-8.
101. Pang CY, Ma YS, Wei YU. MtDNA mutations, functional decline and turnover of mitochondria in aging. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:3661-75.
102. Massard C, Zermati Y, Pauleau AL, Larochette N, Metivier D, Sabatier L, et al. hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene*. 2006;25(33):4505-14.
103. Stepien A, Izdebska M, Grzanka A. The types of cell death. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2007;61:420-8.
104. Effros RB. Replicative senescence of CD8 T cells: effect on human ageing. *Exp Gerontol*. 2004;39(4):517-24.

105. Effros RB. Impact of the Hayflick Limit on T cell responses to infection: lessons from aging and HIV disease. *Mechanisms of ageing and development*. 2004;125(2):103-6.
106. Bree RT, Stenson-Cox C, Grealay M, Byrnes L, Gorman AM, Samali A. Cellular longevity: role of apoptosis and replicative senescence. *Biogerontology*. 2002;3(4):195-206.
107. Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007;292(1):R18-36.
108. Barouki R. Ageing free radicals and cellular stress. *Med Sci* 2006;22:266-72.
109. Hipkiss AR. Errors, mitochondrial dysfunction and ageing. *Biogerontology*. 2003;4(6):397-400.
110. Giordano CR, Terlecky SR. Peroxisomes, cell senescence, and rates of aging. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1822(9):1358-62.
111. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 2007;130(2):223-33.
112. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonian T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2011;479(7372):232-6.
113. Ferbeyre G, Lowe SW. The price of tumour suppression? *Nature*. 2002;415(6867):26-7.
114. Troen BR. The biology of aging. *The Mount Sinai journal of medicine, New York*. 2003;70(1):3-22.
115. Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *J Cancer* 1972;26(4):239-57.
116. Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2002;9:143-6.
117. Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol*. 1994;8(6):665-73.
118. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*. 1998;281(5381):1317-22.
119. Galluzzi L, Morselli E, Vicencio JM, Kepp O, Joza N, Tajeddine N, et al. Life, death and burial: multifaceted impact of autophagy. *Biochemical Society transactions*. 2008;36(Pt 5):786-90.
120. Scherz-Shouval R, Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends in cell biology*. 2007;17(9):422-7.

121. Walburg H. Radiation-induced life-shortening and premature aging. 1975;Adv Radiat Biol(5):145-79.
122. Orgel L. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. Proc Natl Acad Sci 1963;49:517-21.
123. Levine R, Stadtman E. Protein modifications with aging. 1st ed. San Diego: Academic Pres; 1996.
124. Liss AR. Modern aging research, modification of proteins during aging. New York 1985.
125. Chavous DA, Jackson FR, O'Connor CM. Extension of the Drosophila lifespan by overexpression of a protein repair methyltransferase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001;98(26):14814-8.
126. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. Journal of gerontology. 1956;11(3):298-300.
127. Aruoma OI, Kaur H, Halliwell B. Oxygen free radicals and human diseases. Journal of the Royal Society of Health. 1991;111(5):172-7.
128. Davydov VV, Dobaeva NM, Bozhkov AI. Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging. Exp Gerontol. 2004;39(1):11-6.
129. Cand F, Verdeti J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. Free radical biology & medicine. 1989;7(1):59-63.
130. Çakatay U, Telci A, Yılmaz İ, Akçay T, Sivas A. Yaşlanmanın plazma oksidatif protein hasarına etkisi. Cerrahpaşa Tıp Derg. 2000;31:220-3.
131. Sastre J, Pallardo FV, Vina J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. IUBMB life. 2000;49(5):427-35.
132. Lee HC, Wei YH. Mitochondria and aging. Advances in experimental medicine and biology. 2012;942:311-27.
133. Dkhar P, Sharma R. Effect of dimethylsulphoxide and curcumin on protein carbonyls and reactive oxygen species of cerebral hemispheres of mice as a function of age. Int J Dev Neurosci. 2010;28:351-7.
134. Ago T, Matsushima S, Kuroda J, Zablocki D, Kitazono T, Sadoshima J. The NADPH oxidase Nox4 and aging in the heart. Aging 2012;2:1012-6.

135. Doria E, Buonocore D, Focarelli A, Marzatico F. Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;830257:1-12.
136. Garcia-Fernandez M, Sierra I, Puche J, Guerra L, Castilla-Cortazar I. Liver mitochondrial dysfunction is reverted by insulin-like growth factor II (IGF-II) in aging rats. *J Transl Med*. 2011;9:123.
137. Gaunt G, De Duve C. Subcellular distribution of diamino acid oxidase and catalase in rat brain. *J Neurochem*. 1991;2:749–59.
138. Halliwell B. Anti-oxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Rad Res*. 1999;31:261–72.
139. Demiryürek A, Karasu C, Stefek M, Stolc S. Effect of stobadine on leukocyte free radical generation in streptozotocin-diabetic rats: comparison with vitamin E. *Pharmacology*. 2004;70:1-4.
140. Gutman J. GSH Your Body's Most Powerful Protector Glutathione. *Psyconeurobiology & Glutathione*. Montreal: G&S Health Books Inc; 2008. p. 191–93
141. Yalçın S. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim*. 1998;2:342-7.
142. Akın K. Deneysel Karaciger iskemik/Reperfüzyon Modelinde Tioredoksin ve LNAME'in Karaciger Hasarı üzerine Etkilerinin karşılaştırılması: Biyokimya Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara; 2000.
143. Oğuz A. Hepatik İskemi Reperfüzyon Hasarında Curcumin'in Karaciğer Ve Uzak Organ Üzerine Etkilerinin Araştırılması: Tıpta Uzmanlık Tezi. Dicle Ün. Tıp Fak. Genel Cerrahi ABD; Diyarbakır; 2010.
144. Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev*. 2002;54(2):271-84.
145. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *European journal of pharmacology*. 2001;426(1-2):1-10.
146. Ceylan T. Sıçanlarda Oluşturulan İnce Bağırsak İskemi-Reperfüzyon Hasarında Curcumin'in Etkinliği: Tıpta Uzmanlık Tezi. Trakya Ün. Tıp Fak. Çocuk Cerrahisi ABD; Edirne; 2006.
147. Shah PC, Brolin RE, Amenta PS, Deshmukh DR. Effect of aging on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Mechanisms of ageing and development*. 1999;107(1):37-50.
148. Aebi H. Catalase in-vitro assay methods. *Methods Enzymol* 1994;105:121-6.
149. Oral T. İnsan biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık; 2002. 665-74 p.

150. Işık A. Streptozotosinle Oluşturulan Deneysel Alzheimer Modelinde Curcumin Tedavisinin Etkinliği: Tıpta Uzmanlık Tezi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fak. Ankara; 2007.
151. Miquel J, Bernd A, Sempere JM, Diaz-Alperi J, Ramirez A. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. Archives of gerontology and geriatrics. 2002;34(1):37-46.
152. <http://www.hangthebankers.com>.
153. Jaruga E, Salvioli S, Dobrucki J, Chrul S, Bandorowicz-Pikula J, Sikora E, et al. Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes. FEBS letters. 1998;433(3):287-93.
154. Gautam S, Xu Y, Pindolia K, Janakiraman N, Chapman R. Nonselective inhibition of proliferation of transformed and nontransformed cells by the anticancer gent curcumin (diferuloylmethane). Biochemical pharmacology. 1998;55:1333-7.
155. Pan M, Huang T, Lin J. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. Drug Metab Dispos. 1999;27(4):486-94.
156. Yang KY, Lin LC, Tseng TY, Wang SC, Tsai TH. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2007;853(1-2):183-9.
157. Wahlstrom B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. Acta Pharmacologica et Toxicologica. 1978;43(2):86-92.
158. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: a short review. Life sciences. 2006;78(18):2081-7.
159. Jayaprakasha GK, Rao LJM, Sakariah K. Chemistry and biological activities of *C. Longa*. Trends Food Sci Tech. 2005;16:533-48.
160. Sharma R, Gescher A, Steward W. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer 2005;41(13):1955-68.
161. Ahsan H, Parveen N, Khan N, Hadi S. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. Chem Biol Interact. 1999;121:161-75.
162. Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry Eea. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. Cancer Lett 2005;223(2):181-90.

163. Thiagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Life sciences*. 2004;74(8):969-85.
164. Araujo CC, Leon LL. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001;96(5):723-8.
165. Wright J. Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids. *J Mol Struct*. 2002;591:207-17.
166. Manikandan P SM, Aishwarya S, Manohar BM, Lokanadam B, Puvanakrishnan R. Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischaemia in rats. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:1967- 80.
167. Antunes LM, Darin JD, Bianchi NL. Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2001;43(2):145-50.
168. Wang Q, Sun A, Simonyi A, Jensen M, Shelat P, Rottinghaus G, et al. Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. *Journal of neuroscience research*. 2005;82:138–48.
169. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Dietary curcumin counteracts the outcome of traumatic brain injury on oxidative stress, synaptic plasticity, and cognition. *Experimental neurology*. 2006;197(2):309-17.
170. Sng J, Taniura H, Yoneda Y. Histone modifications in kainate-induced status epilepticus. *Eur J Neurosci*. 2006;23:1269-82.
171. Sumanont Y, Murakami Y, Tohda M, Vajragupta O, Watanabe H, Matsumoto K. Prevention of kainic acid-induced changes in nitric oxide level and neuronal cell damage in the rat hippocampus by manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin. *Life sciences*. 2006;78(16):1884-91.
172. Shin HJ, Lee JY, Son E, Lee DH, Kim HJ, Kang SS, et al. Curcumin attenuates the kainic acid-induced hippocampal cell death in the mice. *Neuroscience letters*. 2007;416(1):49-54.
173. Kumar A, Prakash A, Dogra S. Protective effect of curcumin (*Curcuma longa*) against D-galactose induced senescence in mice. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2011;13:42-55.

174. Isik AT, Celik T, Ulusoy G, Ongoru O, Elibol B, Doruk H, et al. Curcumin ameliorates impaired insulin/IGF signalling and memory deficit in a streptozotocin-treated rat model. *Age (Dordr)*. 2009;31(1):39-49.
175. Iwase K, Miyanaka K, Shimizu A, Nagasaki A, Gotoh T, Mori Mea. Induction of endothelial nitric-oxide synthase in rat brain astrocytes by systemic lipopolysaccharide treatment. *J Biol Chem*. 2000;275:11929-33.
176. Farhangkhoei H, Khan Z, Chen S, Chakrabarti S. Differential effects of curcumin on vasoactive factors in the diabetic rat heart. *Nutr Metab*. 2006;3.
177. Feng D, Ohlsson L, Duan RD. Curcumin inhibits cholesterol uptake in Caco-2 cells by down-regulation of NPC1L1 expression. *Lipids in health and disease*. 2010;9:40.
178. Pari L, Tewas D, Eckel J. Role of curcumin in health and disease. *Archives of physiology and biochemistry*. 2008;114(2):127-49.
179. Arun N, Nalini N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant Foods Hum Nutr*. 2002;57(1):41-52.
180. Ramirez-Tortosa M, Mesa M, Aguilera M, Quiles J, Baro L, Ramirez-Tortosa Cea. Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1999;147:371-8.
181. Lin JK, Lin-Shiau SY. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China Part B, Life sciences*. 2001;25(2):59-66.
182. Kim D, Kim S, Choi B, Baek N, Kim M, Kim K. Curcuma longa Extract Protects against Gastric Ulcers by Blocking H2 Histamine Receptors. *Biol PharmBull*. 2005;28(12):2220-4.
183. Vicencio JM, et al. Senescence, Apoptosis or Autophagy. *Gerontology*. 2008;54(2):92-9.
184. Shinyoung H. Antimicrobial activity of wool fabric treated with curcumin. *Dyes and Pigments*. 2005;64:157-61.
185. Garcea G, Jones D, Singh Rea. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer*. 2004;90:1011-5.
186. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th ed. New York, USA: Academic Press; 2002.

187. Baykara B, Tekmen I, Cilaker Mıcılı S, Sönmez Ü, Erbil G, Özoğul C, et al. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında karnozinin profilaksi ve sağaltım etkileri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2010;30(6):1896-905.
188. Yesilirmak C, Kumral A, Tugyan K, Cilaker S, Baskin H, Yilmaz O, et al. Effects of activated protein C on neonatal hypoxic ischemic brain injury. *Brain research*. 2008;56-62.
189. Fitzgerald SP, Compell JJ, Lamont JV. The establishment of reference ranges for selenium. The selenoenzyme glutathione peroxidase and the metalloenzyme superoxide dismutase in blood fractions. In the 5th international symposium on selenium in biology and medicine. 1993.
190. Pleban PA, Munyani A, Beachum J. Determination of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes. *Clin Chem*. 1982;28:311-6.
191. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J LabClin Med*. 1967;1:158-69.
192. Jain SK. Hyperglycemia can cause membran lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264:21340-5.
193. Bulucu F, Vural A, Aydın A, Sayal A. Oxidative stress status in adults with nephrotic syndrome. *Clinical nephrology*. 2000;53:169-73.
194. Buege JA, Aust ST. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 1978;52:302-10.
195. Campisi J. Cellular Senescence and Cell Death. *Physiological Basis of Aging and Geriatrics*. 2003. Epub 3rd.
196. Ganguli M, Chandra V, Kamboh M, Johnston J, Dodge H, Thelma Bea. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer disease: the Indo-US Cross-National Dementia Study. *Arch Neurol*. 2000;57:824-30.
197. Xu Y, Ku B, Cui L, Li X, Barish PA, Foster TC, et al. Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats. *Brain research*. 2007;1162:9-18.
198. Ataie A, Sabetkasaei M, Haghparast A, Moghaddam AH, Kazeminejad B. Neuroprotective effects of the polyphenolic antioxidant agent, curcumin, against homocysteine-induced cognitive impairment and oxidative stress in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2010;96(4):378-85.

199. Banji D, Banji OJ, Dasaroju S, Annamalai AR, . Piperine and curcumin exhibit synergism in attenuating d-galactose induced senescence in rats. *European journal of pharmacology*. 2012.
200. Mann DMA. Vulnerability of specific neurons to aging. In: DB Calne, editor. *Neurodegenerative Diseases*. Philadelphia: WB Saunders; 1994. p. 15-31.
201. Bizon JL, Gallagher M. Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur J Neurosci*. 2003;18:215–9.
202. Kempermann G, Georg Kuhn H, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci*. 1998;18:3206–12.
203. Morterá P, Herculano-Houzel S. Age-related neuronal loss in the rat brain starts at the end of adolescence. *Front Neuroanat*. 2012;6(45).
204. Geng YQ, Guan JT, Xu XH, Fu YC. Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;396(4):866-9.
205. Maslov A, Barone T, Pluskett R, Pruitt S. Neural stem cell detection, characterization and age-related changes in the subventricular zone of mice. *Journal of neuroscience research*. 2004;24:1726-33.
206. Kang SK, Cha SH, Jeon HG. Curcumin-induced histone hypoacetylation enhances caspase-3-dependent glioma cell death and neurogenesis of neural progenitor cells. *Stem cells and development*. 2006;15(2):165-74.
207. Reeta K, Mehla J, Gupta Y. Curcumin is protective against phenytoin-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Brain research*. 2009 1301:52-60.
208. Bala K, Tripathy B, Sharma D. Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. *Biogerontology*. 2006;7:81–9.
209. Khurana S, Jain S, Mediratta P, Banerjee B, Sharma K. Protective role of curcumin on colchicine-induced cognitive dysfunction and oxidative stress in rats. *Human & experimental toxicology*. 2012;31(7):686–97.
210. Belviranlı M, Okudan N, Atalık KEN, Öz M. Curcumin improves spatial memory and decreases oxidative damage in aged female rats. *Biogerontology*. 2013:1-10.
211. Awasthi H, Tota S, Hanif K, Nath C, Shukla R. Protective effect of curcumin against intracerebral streptozotocin induced impairment in memory and cerebral blood flow. *Life sciences*. 2010;86(3):87-94.

212. Agrawal R, Mishra B, Tyagi E, Nath C, Shukla R. Effect of curcumin on brain insulin receptors and memory functions in STZ (ICV) induced dementia model of rat. *Pharmacological Research*. 2010;61(3):247-52.
213. Sudjarwo SA, Sudjarwo KE, Wardani G. Mechanisms of endothelial cell protection by curcumin in hypercholesterolemia. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011;1(10):32-5.
214. Durgaprasad S, Pai CG, Alvres JF, Namitha S. A pilot study of the antioxidant effect of curcumin in tropical pancreatitis. *The Indian journal of medical research*. 2005;122(4):315-8.
215. Kavaklı HŞ, Koca C, Alici Ö. Antioxidant effects of curcumin in spinal cord injury in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 17(1):14-8.
216. Woolley CS, McEwen BS. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci*. 1992;12:2549-54.
217. Frautschy S, Hu W, Kim P, Miller S, Chu T, Harris-White M, et al. Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiology of aging*. 2001;22:993-1005.
218. Zhao J, Zhao Y, Zheng W, Lu Y, Feng G, Yu S. Neuroprotective effect of curcumin on transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain research bulletin*. 2008;1229:224–32.