

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**YAŞLI SIÇANLARDA HİPOKAMPUSTA OKSİDATİF STRES VE BCL-2
İLİŞKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Arzu KESKİN AKTAN

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Kazime Gonca AKBULUT

ANKARA
Şubat 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**YAŞLI SIÇANLARDA HİPOKAMPUSTA OKSİDATİF STRES VE BCL-2
İLİŞKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Arzu KESKİN AKTAN

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Kazime Gonca AKBULUT

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
01/2011- 49 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Şubat 2013

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Fizyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 06/03/2013

**İmza
Prof. Dr. Aydan BABÜL
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**



**İmza
Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT
Gazi Üniversitesi**



**İmza
Doç. Dr. Ethem Gelir
Hacettepe Üniversitesi**



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller, Grafikler	V
Tablolar	VI
Semboller, Kısaltmalar	VII
Önsöz	XII

1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yaşlanma	3
2.1.1. Yaşlanma Fizyolojisi	3
2.1.2. Yaşlanma Teorileri	3
2.1.3. Yaşlanma ve Oksijen	7
2.2. Serbest Radikaller	9
2.2.1. Serbest Radikallerin Oluşumu	9
2.2.2. Serbest Radikallerin Hücrel Komponentlere Etkileri	12
2.2.3. Antioksidanlar	14
2.2.4 Glutasyon	17
2.2.5 Antioksidan Yaşlanma ve Nörodejenerasyon	17
2.2.6. Oksidatif Stres ve Yaşlanma	18
2.3. Apoptoz	23
2.3.1. Apoptozun Organizmada Rol Oynadığı Süreçler	23
2.3.2. Apoptozun İndüklenmesi	24
2.3.3. Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları	25
2.3.4. Apoptozun Moleküler Mekanizmaları	29
2.3.5. Bcl-2 Ailesi	35
2.3.6. Apoptoz ve Oksidatif Stres	38
2.3.7. Apoptoz ve Yaşlanma	40
2.4. Melatonin	42

2.4.1. Melatonin Fizyolojisi	42
2.4.2. Melatoninin Antioksidan Etkileri	44
2.4.3. Melatonin ve Yaşlanma	47
2.4.4. Melatonin ve Apoptoz	48
2.4.5. Melatoninin SSS'deki Yaşlanma ve Nörodejeneratif Olaylara Etkileri	50
2.5. Curcumin	52
2.6. Hipokampus	54
3. GEREÇ ve YÖNTEM	56
3.1. Gereç	56
3.1.1. Deney Hayvanları	56
3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Aletler	59
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	59
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler	61
3.2. Yöntem	64
3.2.1. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu	64
3.2.2. Bradford Protein Tayin Metodu	64
3.2.3. SDS-PAGE (Laemmli) Yöntemi	65
3.2.4. Western Blott Yöntemi	67
3.2.5. Dokuda TBARS Tayin Yöntemi	68
3.2.6. Dokuda Glutasyon Tayin Yöntemi	69
3.2.7. İstatiksel Analiz	70
4. BULGULAR	71
4.1. Hipokampus Doku MDA Düzeyleri	71
4.2. Hipokampus Doku Glutasyon Düzeyleri	72
4.3. Hipokampus Doku Bcl-2 Düzeyleri	73
4.4. MDA, GSH, Bcl-2 Düzeyleri Arasındaki İlişki	74
5. TARTIŞMA	76
6. SONUÇ	83
7. ÖZET	85
8. SUMMARY	87

9. KAYNAKLAR	89
10. EKLER	115
11. ÖZGEÇMİŞ	116
12. TEŞEKKÜR	117

ŞEKİLLER, GRAFİKLER

Şekil 1: DNA hasarının normal hücre siklusu üzerine etkisi	22
Şekil 2: P53 geninin apoptotik kontrolü	28
Şekil 3: C.elegans, mitokondri, ER ve ölüm reseptörleri düzeyinde gerçekleşen kaspaza bağlı apoptotik yolların homolojileri	33
Şekil 4: Kaspaz bağımlı intrinsik ve ekstrinsik yollar	34
Şekil 5. Karanlık/aydınlık uyarı ile melatonin sentezinin düzenlenmesi	43
Şekil 6. Fizyolojik ve stres koşulları altında melatonin ve ROS ilişkisi	46
Şekil 7: Melatonin ve apoptoz ilişkisinin moleküler mekanizması	49
Grafik 1: Hipokampus MDA düzeylerinin gruplara göre değişimi	71
Grafik 2: Hipokampus GSH düzeylerinin gruplara göre değişimi	72
Grafik 3: Hipokampus Bcl-2/beta aktin düzeylerinin gruplara göre değişimi	73

TABLÖLAR

Tablo 1: Yaşlanma teorilerinin sınıflaması	5
Tablo 2: Makromolekül hasar örnekleri	6
Tablo 3: Reaktif oksijen türleri	10
Tablo 4: Reaktif azot türleri	10
Tablo 5: Antioksidanların enzimatik özelliklerine göre sınıflandırılması	15
Tablo 6: Endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidanlar	15
Tablo 7: Bcl-2 ailesinin sınıflaması	35
Tablo 8: Oksidatif stresin rol oynadığı apoptoz uyaranları	39
Tablo 9: Deney grupları ve özellikleri	58
Tablo 10: Deneyde kullanılan antikorlar ve diğer malzemeler	60
Tablo 11: Grupların istatistiksel değişimleri (ortalama $\pm$ SH)	75

SEMBOLLER, KISALTMALAR

AIF	Apoptoz indükleyici faktör
AP-1	Aktivatör protein
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
ATP	Adenozin tri fosfat
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 antagonistic killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B cell lymphoma-2 protein
Bcl-xl	Bcl-extra long
Bcl-xs	Bcl-extra short
BHT	Butillenmiş hidroksi toluen
Bid	Bcl-2 interacting domain death agonist
Bik	Bcl-2 interacting killer
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
Bmf	Bcl-2 modifying factor

Bok	Bcl-2 related ovarian killer
Boo	Bcl-2 homolog of ovary
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Siklik adenzin mono fosfat
CDK	Siklin bağımlı kinaz
COX-2	Siklooksijenaz 2
Cyt c	Sitokrom c
dATP	Deoksi ATP
DISC	Death-inducing signaling complex
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid); Elman reaktifi
eNOS	Endotelyal NOS
FADD	Fas-associated death domain protein
GPx	Glutasyon peroksid (GSH-Px)
GRd	Glutasyon redüktaz (GSH-Rd)
GSH	Glutasyon

GSSG	Okside GSH
HIF-1 α	Hipoksi indükleyici faktör -1alfa
HtrA	High-temperature requirement A
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IAPs	Inhibitor of apoptosis protein
ICE	İnterlökin 1b dönüştürücü enzim
IL	İnterlökin
IMM	Mitokondriyal iç membran
İp	Intraperitoneal
MDA	Malondialdehid
Mdm2	Murine double minute 2
MnSOD	Manganez süperoksit dismutaz
MT1-2	Melatonin reseptörü 1-2
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid- indirgenmiş NAD
Na ₂ HPO ₄	Disodyum hidrojen fosfat

NaOH	Sodyum hidroksit
NDGA	Nordihydroguaiaretic acid
NF-κB	Nuclear factor kappa B
nNOS	Nöronal NOS
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
Nrf2	NF-E2 related factor-2
O ₂	Oksijen
•OH	Hidroksil radikali
Omi	Memeli serin proteaz
ONOO	Peroksinitrit
PBS	Phospat buffered saline
pRb	Retinoblastoma protein
ROR	Tirozin kinaz benzeri orphan reseptör
ROS	Reaktif oksijen türleri
RZR	Retinoid Z reseptör

Sc	Subkutan
SCN	Suprakiazmatik nukleus
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SMAC	Second mitochondrial activator of caspase
SOD	Süperoksit dismutaz
STAT 3	Signal transducer and activator of transcription 3
TBA	Tiobarbitürik asit
TBARS	Tiobarbitürik asit reaktifi
TCA	Triklora asetik asit
TNFa	Tümör nekroz faktör-alfa
TNF-R	Tümör nekroz faktör reseptörü
TRADD	TNF-receptor-1 associated death domain protein
UPR	Unfolded Protein Response

ÖNSÖZ

Yaşlanma özellikle kognitif fonksiyonlarda ve motor aktivitelerdeki gerilemeler ile kendini göstermektedir. Yaşlanma süreci progresif ve kümülatif olarak gerçekleşmektedir. Özellikle oksidatif stresin neden olduğu hücresel hasarların zaman içerisinde birikerek hücrelerin fizyolojik fonksiyonlarında kayıplara neden olduğu düşüncesi yaygın olarak bilim dünyasında kabul görmektedir.

Yaşlanmayla beraber antioksidan sistemlerin etkinliği de azalmaktadır. Dolayısıyla radikal hasarı azalttığı bilinen melatonin ve curcumin gibi antioksidan tedavi yöntemleri yaşlanmayla ilgili çalışmalarda yer almaktadır. Çalışmamızda melatonin ve curcumin uygulamalarının, yaşlı sıcanların hipokampus dokusunda MDA, GSH ve bcl-2 düzeylerini nasıl etkilediğini araştırmayı hedefledik.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Organizmaların temel canlılık birimi olan hücrelerin metabolik ve fizyolojik gereksinimleri karşılanmadığında ya da yetersiz kaldığında yaşam döngüsü yaşlanma ve ölümle sonuçlanır. Yaşlanma sürecini açıklamaya çalışan çok sayıda teori bulunmasına karşın, mekanizması halen tam olarak açıklanamamıştır. Bu konuda kabul gören en popüler teorilerden serbest radikal teorisi yaşlanmanın esas olarak radikallerin DNA, protein ve lipit yapısı üzerine yaptığı hasarların birikimi sonucu ortaya çıktığını söyler.^{1,2} Moleküler teoriler ise yaşlanmanın birçok gen ekspresyonundaki değişiklikler sonucunda oluştuğunu belirtir.³ Programlı ve fizyolojik bir ölüm şekli olan apoptozis ise hücre sayısının kontrolü, hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengeyi sağlayan önemli bir mekanizmadır. Dolayısıyla apoptotik düzenlemedeki bozuklukların da yaşlanmada rol oynayabileceği anlaşılmıştır.^{4,5}

Yaşlanma ile birlikte sinir sistemindeki gerileme fizyolojik yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olup en iyi gösterge hafıza ve kognitif fonksiyonlardaki kayıplardır. Yaşlanmayla beraber, nöroenezisin en aktif olduğu yerlerden biri olan hipokampusta var olan nöron sayısı ve NSC (neural stem/progenitor cells) hücrelerinin proliferasyonu ve sağkalım oranları da azalmaktadır.^{6,7} Bu durum yaşlanmayla beraber hipokampusta ROS üretiminin artışı, antioksidan savunma sistemlerinin (GSH enzim sistemi, SOD, katalaz vb) azalması, lipit peroksidasyon ürünü MDA düzeylerinin artışı ile ilişkilendirilmiştir.^{8,9} Hipokampusta nöronal hasarın büyümesi, antioksidan ve antiapoptotik özelliğe sahip bcl-2 up-regulasyonunun bozulmasına ve sonuçta azalmış bcl-2 düzeyine paralel nöronal apoptozda artışa neden olmaktadır.^{10,11}

Pineal bezin esas olarak salgıladığı melatonin hormonu organizmanın antioksidan savunma sisteminde yer alan ve serbest radikal süpürücüsü olarak bilinen önemli bir hormondur. Melatonini üstün kılan lipofilik ve hidrofilik özelliği ile bütün hücre ve hücre içi kompartmanlardan, kan-beyin bariyerinden kolaylıkla geçebilmesi ayrıca; serbest radikal süpürücü etkisi için herhangi bir bağlanma bölgesine ve reseptöre de ihtiyaç duymamasıdır.^{12,13} Ancak ilerleyen yaşla beraber melatonin düzeyinde azalma görülür.¹⁴

Lipofilik özellikli bir polifenol olan Curcuminin oldukça güçlü antinflamatuar, antiproliferatif, antioksidan ve antitümör etkilerinin olduğu bilinmektedir.^{15,16,17} Curcuminin yapısında azid, halopiroksil, Br₂ radikalleri ile birlikte birçok reaktif oksidanla reaksiyona giren fenolik OH grubu yer alır. Antioksidan etkisi, fenolik yapısından ve β diketon türevinden ileri gelir.

Melatonin^{18,19} ve Curcuminin^{20,21} antioksidan ve antiapoptotik karakterleri ile hipokampusta nöroprotektif etkilerinin gösterilmiş olması araştırmamızın şekillenmesini sağlamıştır. Çalışmamızda orta yaşlı sıçanlarda melatonin ve curcumin uygulamasının hipokampus dokusunda oksidatif stresin göstergesi MDA, antioksidan fonksiyon göstergesi olarak GSH ve hücrel redoks düzenleyici bcl-2 düzeylerini nasıl etkilediğini araştırmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yaşlanma

2.1.1. Yaşlanma Fizyolojisi

Yaşlanma, organizmada moleküler, hücresel, organ ve sistemik düzeyde ortaya çıkan kompleks bir süreçtir. Zamana bağlı olarak organizmanın stres oluşturan koşullara adaptasyonlarının ortadan kalkması ve genetik stabilitesinin bozulması yaşlanmanın en önemli karakteristikleridir. Yaşlanma sürecinde genetik olarak programlanmış yaşlanma mekanizmaları ve hasar/hata kabul edilebilecek mekanizmalar rol oynar örneğin; nöroendokrin ve immün sistem koordinasyonlarının bozulması, genetik bilgi kaybı, yapısal hasarlar ve yerine koyma/tamir mekanizmalarının bozulması gibi.^{22,23}

Makromoleküllerde ortaya çıkan hasarlar hücrede geri dönüşümsüz bir şekilde yığıldıklarında mitotik hücreler replikasyondan kaçınırlar ve kalıcı bir şekilde hücre siklusunu durdururlar yada hücrede ölüm programlarını tetiklerler. Bu süreçte yaşlanma ve yaşlanmayla ilgili patolojilerde rol oynar.²⁴

2.1.2. Yaşlanma Teorileri

Birçok araştırmacıya göre yaşlanma, yaşamın başlangıcından üreme (reprodüktif) olgunluğuna kadar devam eden, biyolojik süreçlerin tümünde yürütülen amaçlı genetik programla ilgilidir. Ancak; üreme olgunluğuna bir kez erişildikten sonra yaşlanma süreçlerinin genetik programın bir devamı mı yoksa moleküler bütünlükte rastgele oluşan ve telafisi imkansız kayıpların bir sonucu mu olduğu konusu halen tartışmalıdır.^{22,25}

Yaşlanma teorilerinin rasyonel bir sınıflaması ilk kez 1990 yılında Medvedev tarafından yapılmış ve 300 den fazla teoriden bahsedilmiştir. Ancak bahsedilen teorilerin çoğu ‘hipotez’ yada ‘teorimsi’ olarak kalmıştır.²⁶ Günümüzde de yaşlanma sürecini açıklamaya çalışan çok sayıda teori mevcuttur ancak en yaygın kullanımı olan sınıflama şekli yaşlanmanın ‘programlı’ ve ‘raslantısal (hata/hasar)’ teorileridir.^{24,27} Temelde bu iki başlık altında toplanabilecek teori/hipotezler her ne kadar ortak paydalara sahip olsalar da çok sayıda farklı kavram türemesine neden olmuştur.

Yaşlanma teorileri bahsedilen bu iki ana başlıkla ilişkili olarak evrimsel, moleküler, hücresel ve sistemik düzeyde açıklanmaya çalışılmaktadır.^{27,28,29} Örnek bir sınıflama şekli Tablo 1’de açıklamaları ve referanslarıyla birlikte verilmiştir.

Tablo 1: Yaşlanma teorilerinin sınıflaması

Biyolojik düzey	Teori	Açıklama	Ref.
Evrimsel	Mutasyon birikimi	Organizmaya zarar veren ve etkisi geç dönemde açığa çıkan mutasyonların birikimi, ilerde patolojik hastalıklar ve yaşlanmayla sonuçlanır. Bu teoriyi kanıtlayacak yeterli deneysel çalışma yoktur.	27,29,30,31
	Disposable soma	Somatik hücreler sahip oldukları sınırlı enerjiyi büyüme ve gelişmenin yanısıra asıl hedefleri olan üreme (reproduction) için kullanırlar. Üreme evresinden sonra somatik hücreler işlevsiz hale gelir. Bu teori neden belli bir yaşam süremiz olduğunu söyler ancak; yaşlanmanın spesifik nedenini söylemez. Üreme ve yaşam süresi arasında antagonistik bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.	27,29,32,33
	Antagonistik pleitropi	Erken yaşlarda yararlı etkisi olan genlerin sonraki dönemde yaşlanmaya neden olabilecek zararlı etkileri görülebilir.	27,29,34
Moleküler	Gen regülasyon	Yaşam süresinin belirlenmesi ve yaşlanma sürecinin gerçekleşmesi bazı gen ekspresyonlarında değişiklikler ile meydana gelmektedir.	35,36,37
	Kodon restriksiyonu	Kodon hataları/eksikliği uygun olmayan mRNA translasyonuna neden olur.	27,29
	Hata katastrofu	Yaşlanmayla birlikte uygun olmayan gen ekspresyonlarındaki artış beraberinde anormal yapıli proteinlerin artışına neden olur.	27,29
	Somatik mutasyon	İlerleyen yaşla beraber özellikle DNA/genetik materyalde moleküler hasar ve birikimi artar. Ancak bu durum her zaman yaşam süresi ile ilişkili değildir.	27,29
	Disdiferensiasyon	Rastlantısal moleküler hasarlardaki kademeli artış gen ekspresyon regülasyonunu bozar.	27,29
Hücresel	Hücresel yaşlanma-telomer teorisi	Telomer kısalmasına bağlı olarak, hücre mitotik uyarılara karşı yanıt veremez hale gelir (replikatif yaşlanma). Replikatif kapasitesini henüz tamamlamamış olan bir hücre eğer strese maruz kalırsa benzer yaşlanma sürecini başlatabilir.(SIS;stres-induced senescence)	27,29,38,39,40
	Serbest radikal	Oksidatif metabolizma sonucu üretilen reaktif serbest radikaller lipid, protein ve DNA yapılarına zarar verir.	27,29,41
	Yıpranma ve yıkım (wear-and-tear)	Yaşam süresince oluşabilecek doğal zedelenmeler yaşlanmayla sonuçlanır.	27,29
	Apoptozis	Genetik kontrol altında gerçekleşen programlı hücre ölümü	4,27
Sistemik	Nöroendokrin	Nöroendokrin sistemin fonksiyonel kapasitesindeki azalma yaşla ilişkili fizyolojik olgularda etkilidir.	27,29,42,43
	İmmünolojik	İmmün yetersizlikler kanser, enfeksiyöz ve otoimmün hastalıkların artışına neden olur.	27,44,45,46
	Yaşam hızı (rate-of-living)	Her canlı organizmanın önceden belirli ve sınırlı düzeyde metabolik potansiyeli olduğu varsayılır. Bu potansiyelin tüketim hızı yaşam süresinin belirler (hızlı yaşa, genç öl.)	27,29,47

Organizmayı yaşlanma sürecine sokan rastlantısal yada rastlantısal olmayan hasar/hata teorilerine ilişkin çalışmalar halen popülaritesini korumaktadır. Hücre içinde hasara neden olabilecek kaynaklar başlıca üç kategoriye ayrılabilir:

1. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikaller
2. Besinlerle alınan glukoz ve metabolitleri ve bunların ROS'larla reaksiyonu
3. Biyokimyasal süreçlerde gelişen spontan hatalar (DNA duplikasyonları, DNA'da transkripsiyon, transkripsiyon sonrası süreçlerde, translasyon ve translasyon sonrası süreçlerde modifikasyonlar)

Farklı organ, doku ve hücrelerde, makromoleküler düzeyde yaşla ilintili hasarların başlıcaları Tablo 2'de gösterilmiştir.²⁴

Tablo 2: Makromolekül hasar örnekleri

Makromolekül	Hasar örnekleri
DNA (nükleer ve mitokondriyal)	Mutasyonlar, epimutasyonlar, baz modifikasyonları, dizilerin kopması yada yer değiştirmesi
RNA	Baz modifikasyonları, hatalı kodlama, hatalı ekleme
Protein	Aminoasit modifikasyonları, hatalı inkorporasyon, hatalı katlanma, agregasyon
Karbonhidrat, lipidler ve moleküler konjugatlar	İleri glikasyon son ürünleri (AGEs: advanced glycation end-products), lipofussin oluşumu, agrezomların oluşması

Yaşam süresince özellikle serbest radikallerin ve reaktif türlerin makromoleküller üzerindeki etkisi antioksidan savunma sistemleri ile giderilmeye çalışılır. Hücreler, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimleriyle ve dışarıdan aldığı C vitamini, E vitamini ve karotenoid gibi diğer antioksidanlarla oksidatif stresin yarattığı yıkıcı etkileri önlemeye çalışırlar. Ancak; antioksidan savunma ve DNA tamir sistemlerinin azalmasıyla beraber makromoleküler düzeyde maruz kalınan hasarlar ve ilişkili genetik programlamalar organizmayı yaşlanma ve sonuçta ölüm sürecine sokar.

2.1.3. Yaşlanma ve Oksijen

Max Rubner'in 1908 yılında yayımlanan literatürü memelilerde oksijen tüketim hızı ile ömür uzunluğu arasındaki ters orantıya işaret eden ilk bilimsel kayıttır.⁴⁸ Bunun ardından Pearl ve arkadaşları tarafından 'rate of living' adıyla genişletilen hipoteze göre yaşam süresince enerji tüketimi sınırlıdır ve oksijen tüketimi yada metabolizma hızı ne kadar yüksekse yaşam süresi de o kadar kısa olacaktır.⁴⁷ Bu hipotez uzun süre kabul görmese de aslında 'rate of living' teorisi atmosferde % 21'lik oranın üzerindeki oksijen konsantrasyonunun hemen hemen tüm hayvanlar için toksik ve % 100 oksijenin ise tüm memeliler için fatal olması gözlemiyle uyumludur.^{49,50} Bununla beraber 1938'de sıçanlarda hiperoksi ile yüksek metabolizma hızının ölümü çabuklaştırdığı, düşük metabolizma hızının ise ölümü geciktirdiği bildirilmiştir.⁵¹

Gomberg' in 1900'lü yıllarda trifenilmetil($\text{Ph}_3\text{C}\cdot$) serbest radikalinin varlığını ispatlaması⁵² ve ardından 1954 yılında serbest oksijen radikallerinin biyolojik sistemlerde oldukça reaktif oldukları, radyasyon varlığında ve oksijen zehirlenmesinde ciddi toksik etkilere sahip olduğunun

gösterilmesiyle beraber⁵³ serbest oksijen radikalleri üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır.

1956 ve sonrasında yaptığı çalışmalarla Denham Harman ilk kez serbest oksijen radikallerinin (özellikle de hidroksil ve hidroperoksil radikalleri), oksijen kullanan organizmalarda biyokimyasal ve metabolik süreçler sonucunda oluştuğunu ve bu radikallerin hücresel bileşenlerle reaksiyona girerek yaşlanmaya eşlik eden değişimleri başlattığını, hatta yaşam süresinin asıl belirleyicisi olduklarını belirtmiştir. ^{41,54}

İlerleyen yıllarda serbest oksijen radikalleri ile ilgili yapılan diğer çalışmalar, süperoksit dismutazın keşfi⁵⁵ ve in vivo olarak H₂O₂ (hidrojen peroksit)' in varlığının gösterilmesi⁵⁶ Harman tarafından tanıtılmış olan yaşlanmanın 'serbest radikal teorisi' ni çok daha geçerli kılmıştır. Yaşlanma sürecinde hasara neden olan söz konusu moleküllerin hepsinin radikal olmamakla birlikte oldukça 'reaktif oksijen türleri (ROS)' olduklarının anlaşılması, serbest radikal teorisinin yaşlanmanın 'oksidatif stres teorisi' olarak adlandırılmasına neden olmuştur.

Serbest radikal teorisiyle ilişkili olarak mitokondriye merkezi bir rol atfeden de yine Harman olmuştur⁵⁷. Mitokondriyal solunum zincirinin hücredeki oksijen radikalleri için esas kaynak oluşturduğu ve tüketilen oksijenin yaklaşık %1-4'lük kısmının serbest radikallere dönüştüğü ise ancak 1988 yılında kesinlik kazanmıştır⁵⁸.

Harman' ın çalışmalarına paralel olarak ROS'ların dolayısıyla hücrenin maruz kaldığı oksidatif stresin, yaşlanma süreciyle olan ilişkisi

günümüz de araştırılmaya devam edilmektedir.^{59,60,61} Oksidatif stres ve yaşlanma ilişkisine daha sonra tekrar değinilecektir.

2.2. Serbest Radikaller

2.2.1. Serbest Radikallerin Oluşumu

Bir orbitalde bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanır. Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler ancak; serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller elektriksel olarak anyonik, katyonik veya nötral olabilirler.

Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış elektrona sahiptir bu nedenle biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer.

Moleküler oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) oluşur. $^1\text{O}_2$ 'nin ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmamakla beraber reaktif haldeki bir oksijen molekülüdür. Dolayısıyla moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir.

Organizmada normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan ROS'lar antioksidan savunma sistemleri tarafından etkisiz hale getirilirken bu dengenin sağlanamadığı durumlarda 'oksidatif stres'

durumu ortaya çıkar. Tablo 3 ve Tablo 4 ' te gösterilen reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) oksidatif strese neden olan önemli faktörlerdendir.

Tablo 3: Reaktif oksijen türleri

Reaktif Oksijen Türleri			
Radikaller		Non-Radikaller	
Süperoksit	$O_2^{\bullet-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksi	$OH^{\bullet}$	Hipoklorik asit	$HOCl$
Peroksi	$ROO^{\bullet}$	Hipobromik asit	$HOBr$
Alkoksi	$RO^{\bullet}$	Ozon	O_3
Hidroperoksi	$HOO^{\bullet}$	Singlet oksijen	1O_2

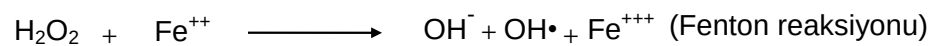
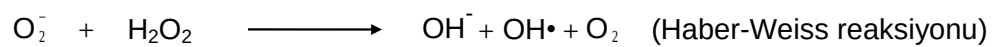
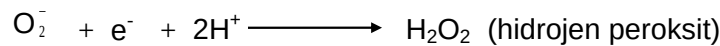
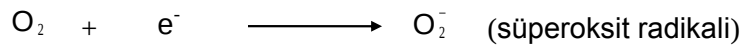
Tablo 4: Reaktif azot türleri

Reaktif Azot Türleri			
Radikaller		Non-Radikaller	
Nitrikoksit	$NO^{\bullet}$	Nitroz asit	HNO_2
Nitrojendioksit	$NOO^{\bullet}$	Nitrozil katyonu	NO^+
		Nitroksi anyonu	NO^-
		Dinitrojen tetraoksit	N_2O_4
		Peroksinitrit	$ONOO^-$
		Peroksinitroz asit	$ONOOH$
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Alkilperoksi nitritler	$ROONO$

ROS oluşumuna sebep olan ekzojen kaynaklar; sigara, radyasyon, organik çözücüler, UV ışınları pestisitler ve çevre kirliliğidir. En önemli endojen kaynaklar ise;

1. Mitokondriyal elektron transportundaki sızıntı (%50'den fazla)
2. Peroksimal yağ asit metabolizması
3. Endoplazmik retikulumda p450 reaksiyonu içeren NAD(P)H-bağımlı elektron transportu
4. Fagositik aktivite
5. Enzimlerin katalitik döngüsü (ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, dihidroorotat dehidrojenaz, flavoprotein dehidrojenaz, aa oksidaz, triptofan dioksijenaz vb enzimler)
6. Bazı bileşiklerin otooksidasyonu (askorbik asit, tiyoller, adrenalin, flavin koenzimleri vb.)
7. Özellikle Fe^{3+} , Cu^{2+} gibi geçiş metalleri ile gerçekleşen oksidoredüksiyon reaksiyonları.

ROS'ların oluşum basamakları ise aşağıdaki gibidir. Hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali oluşur, bu radikalin asıl önemi H_2O_2 kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.



H₂O₂ bir nonradikal-ROS olmakla beraber Fe²⁺ veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalının varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest radikal olan hidroksil (OH•) radikalini oluşturur.

Reaktif azot türlerinden olan NO• ise L-arginin'den, nitrik oksit sentaz (NOS) enzim aktivitesi ile üretilir. NO• nöral sinyalizasyon, kan basıncı ve platelet fonksiyonlarının regülasyonunda rol almakla beraber fazla üretiminde ise doku hasarına neden olmaktadır.^{62,63}

2.2.2. Serbest Radikallerin Hücresel Komponentlere Etkileri

Serbest radikaller, antioksidan sistemlerle dengelenmediği zaman başta lipidler olmak üzere, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli hücresel bileşenler hasar görmeye başlar. Süperoksit ve hidroksil radikali sitoplazma, mitokondri, endoplazmik retikulum ve nükleus membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatarak membran permeabilitelerini arttırır.

Biyomembranlar ve hücre içi organeller (mitokondri, endoplazmik retikulum), membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeniyle oksidatif ataklara duyarlıdırlar. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere (keton, alkol, eter vb) dönüşmesi ile sona

ermektedir.⁶⁴ Bu bileşiklerden biri olan malondialdehit (MDA) miktarı, tiyobarbitürik asit testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır.⁶⁵

Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA' da okside olur. Nükleer DNA'ya kıyasla mitokondriyal DNA'nın histon içermeyen yapısı oksidatif strese karşı mitokondriyi daha savunmasız hale getirir. Özellikle OH• radikali DNA ayrılması, DNA-protein çarpaz bağlanımı ve pürinlerin oksidasyonuna sebep olduğunda DNA tamir sistemi hemen devreye giremez ve DNA rejenerasyonu sağlanamazsa replikasyon sırasında yanlış baz çifti mutasyonları gerçekleşir. Bu mekanizma oksidatif strese maruz kalan kişilerde artmış kanser prevelansını açıklamakla beraber oksidatif strese bağlı oluşan apoptozda, yaşlanmayla ilişki diğer sistemik ve nörodejeneratif hastalıklarda da benzer DNA hasar/mutasyonlarına sebep olmaktadır.^{66,67}

OH• radikali dışındaki diğer oksijen radikalleri ve yüksek oksidasyon potansiyeline sahip olup kolayca radikallere dönüşebilen H₂O₂, HOCl, O₃, ONOO⁻ gibi non-radikallerde DNA hasar ve mutasyonlarında rol oynamaktadır.⁶⁷

Biyomoleküllerin oksidatif hasarı; DNA, lipid veya proteinlerin oksidatif hasara uğraması sonucu oluşan ürünlerinden hesaplanabilir. Bu amaçla DNA'ların oksidasyonu sonucu oluşan 8-hidroksideoksiganizin (8-OH-dG), lipidlerin oksidasyonu sonucu oluşan izoprostanlar ve tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddeler (TBARS), proteinlerin

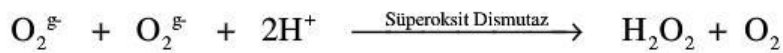
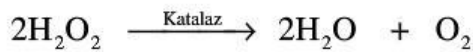
oksidasyonu sonucu ise yapıları değişmiş aa'lerin (protein karbonillerinin) konsantrasyon ölçümleri en sık kullanılan yöntemlerdir.

2.2.3. Antioksidanlar

Biyolojik sistemlerde antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin bulunması yaşam için temel bir ihtiyaçtır. Biyomoleküllerin istenmeyen oksidasyonlarını engelleyen antioksidalar, oksidasyonu başlangıç veya gelişme basamağında yada her iki basamakta önleyen veya geçiktiren maddelerdir. Anti-mutajenik, anti-karsinojenik ve anti-aging gibi bir çok biyolojik fonksiyon antioksidanlar kaynaklı savunma sistemleri sayesinde gerçekteşir.⁶⁸

Antioksidanlar yapıları, etki mekanizmaları yada edinim kaynaklarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılmaktadır. Örnek bir sınıflama Tablo 5 ve Tablo 6 'da gösterilmiştir.

Endojen kaynaklı ve enzimatik özellik gösteren katalaz ve glutatyon peroksidaz, H₂O₂ 'in uzaklaştırılmasında görev alırken, süperoksit dismutaz (SOD) ise dismutasyon reaksiyonunu katalizler ve süperoksidin uzaklaştırılmasını sağlar.



Tablo 5: Antioksidanların enzimatik özelliklerine göre sınıflandırılması

Enzimatik	Primer	Süperoksit dismutaz
		Katalaz
		Glutasyon peroksidaz
	Sekonder	Glutasyon redüktaz
		Glukoz 6-fosfat-dehidrogenaz
Non-enzimatik	Vitaminler	A (retinol)
		C (askorbik asit)
		E (tokoferoller, tokotrienoller)
		K
	Karotenoidler	β -karoten
		Likopen
		Lutein
		Zeksantin
	Mineraller	Çinko
		Selenyum
	Organosülfür bileşikler	Glutasyon
		İndol
		Alil sülfid
	Fenolik asitler	Hidroksisinnamik asitler
		Hidroksibenzoik asitler
	Kofaktörler	Koenzim Q10
	Nitrojen non-protein bileşikler	Ürik asit

Tablo 6: Endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidanlar

ANTİOKSİDANLAR			
Endojen kaynaklı		Ekzojen kaynaklı	
Enzimler	Küçük moleküller	Doğal	Sentetik
Katalaz	Glutasyon	Tokoferoller	BHA
Peroksidaz	Askorbik asit	Fenoller	BHT
Süperoksit dismutaz	Ürik asit	Karotenler	TBHQ
Glutasyon peroksidaz	Metal bağlayıcılar (hb, myg vb.)	Flavonlar	Propilgallat
Glutasyon redüktaz		Katekinler	NDGA

Besin kaynaklı antioksidanlar ise genellikle fenolik ve non-enzimatik yapıdaki bileşiklerdir. Bir çok bitkinin yaprak, gövde ve tohumlarında bulunan en önemli doğal kaynaklı antioksidanlar karetenoidler, vitaminler, fenoller, flavonoidler, glutatyon ve endojen metabolitleridir. Maaliyet nedeniyle yirminci yüzyılın başlarından itibaren kullanılmaya başlayan sentetik antioksidanlar da değişik derecelerde substitue olmuş alkil gruplarına sahip fenolik yapıdaki bileşiklerdir. Sentetik antioksidanların faydalarına ilişkin farklı görüşler olsa da içlerinde en yaygın olarak kullanılanları BHA ve BHT'dir.

Antioksidan kapasiteye sahip olan moleküller; elektron alım yada verim yolu ile, serbest radikalik zincir reaksiyonlarını durdurarak, metalleri şelatlayarak yada singlet oksijeni gidermek suretiyle etkilerini gösterebilirler.

Antioksidan savunma sistemi türler arasında farklılık gösterebilir çünkü her canlının sahip olduğu endojen ve ekzojen antioksidan kaynakları farklıdır ayrıca maruz kaldıkları oksidatif stres düzeyinin de değişkenliği türler arasında savunma sistemi ve yaşam süresi farklılıkları gibi farklar doğurur. Ancak ortamdaki antioksidan miktarının artması ile oksidasyonun da aynı doğrultuda azalacağını düşünmek her koşulda doğru değildir. Örneğin fenolik antioksidanlar, antioksidan özelliklerini yüksek konsantrasyonlarda kaybedip akabinde oksidasyonu hızlandırıcı etki gösterebilirler. Ortamdaki O₂ düzeyi, geçiş metallerinin varlığı vb koşullar ROS ve fenolik radikallerin de oluşumuna neden olarak prooksidant etkilerin açığa çıkmasına neden olabilir. Dolayısıyla uygun koşullar sağlanamadığında antioksidan karakterli moleküllerde prooksidant etkiler yaratabilir.⁶⁹

2.2.4 Glutasyon

Canlıların yaşamı için glutasyonun redükte formunun (GSH) yüksek, okside olmuş (GSSG) formunun ise daha az konsantrasyonda olması gerekir. İntrasellüler konsantrasyonu daha çok olan GSH, selenyum içeren glutasyon peroksidaz enzimi ile GSSG'ye dönüştürülür. Bu reaksiyonunun tersini ise glutasyon reduktaz katalizler. Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan olan GSH hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürüp, hücreleri endojen ve ekzojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korur.⁷⁰ (OH•, lipid peroksil, peroksinitrit, H₂O₂ ile gerçekleştirdiği enzimatik reaksiyonlar ile) Ayrıca proteinlerin sülfhidril (SH) gruplarının korunması ve bazı reaksiyonlarda koenzim olarak görev yapmasının yanı sıra amino asit transportunda, protein ve DNA sentezinde de önemli rol oynar.

2.2.5 Antioksidan Yaşlanma ve Nörodejenerasyon

Biyomoleküllerin istenmeyen oksidasyonlarını engelleyen antioksidanlar, oksidasyonu başlangıç veya gelişme basamağında yada her iki basamakta önleyen veya geçiktiren maddelerdir. Yaşam süresince özellikle serbest radikallerin ve reaktif türlerin makro moleküller üzerindeki yıkıcı etkisi antioksidan savunma sistemleri ile giderilmeye çalışılır.^{1,2,71} Hücreler, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidaz gibi enzimleriyle ve dışarıdan aldığı C vitamini, E vitamini ve karetenoid gibi diğer antioksidanlarla oksidatif stresin yarattığı yıkıcı etkileri önlemeye çalışırlar.

Beyin dokusu yüksek miktarda oksijen tüketimi ile beraber metabolik aktivitesi sonucu önemli miktarda da serbest radikal oluşturur. Ayrıca poliansatüre yağ asidi, demir ve askorbat içeriğinin de yüksek oluşu bu organı reaktif oksijen türleri (ROS) için önemli bir hedef haline getirir.⁷²

Bununla beraber, beyin dokusunun antioksidan savunma mekanizmalarından görece fakir oluşu oksidatif hasarın gelişme potansiyelini artırır.⁷¹

Alzheimer, Parkinson, Huntington koresi ve Amyotrofik Lateral Skleroz gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarda hatalı protein üretimi, oksijen radikali yapımında artış, hücre içi Ca artışı gibi mekanizmalarla nöron kayıplarının meydana geldiği gösterilmiştir.⁷³ Yaşlanmayla ilişkili gelişen, kognitif bozukluklar ve demansla karakterize Alzheimer hastalığında beyin atrofisi, hipokampus, frontal korteks ve limbik bölgelerde de kademeli nöron kaybı görülür.⁷⁴ Bunun yanı sıra bu bölgelerde GSH, GSH reduktaz, GSH-Stranferaz, SOD, katalaz, tiyoredoksin reduktaz gibi antioksidan enzimlerin azaldığı, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve nitrasyonunun ise arttığı gösterilmiştir.^{75,76}

Antioksidan savunma ve ilişkili DNA tamir sistemlerinin yetersiz kalması, makromoleküler düzeyde maruz kalınan hasarların zamanla birikimine, ilişkili genetik programlamaların devreye girmesine ve sonuçta organizmanın yaşlanma ve ölüm sürecine girmesine neden olacaktır.

2.2.6. Oksidatif Stres ve Yaşlanma

Telomer kısalması, DNA hasarı ve oksidatif stres en iyi tanımlanmış senesens (yaşlanma) uyarıcılarıdır. Hücre siklusu regülasyonunda rol oynayan ve tümör supresör genler olarak bilinen p53 ve Rb (pRb) proteinleri hücrel yaşlanmanın moleküler mekanizmalarında anahtar rol oynarlar. Normalde inaktif durumda bulunan

p53 geni, oksidatif stres gibi DNA hasarı oluşumuna neden olan herhangi bir hücresel stres koşulunda aktifleşir. Akabinde ise p21(siklin bağımlı kinaz inhibitör) genini harekete geçirir. p21 geni, cyclin- CDK1/2 komplekslerini inhibe ederek hücre siklusunu geç G_1 fazında (DNA hasar tamiri ve RNA, protein sentezi safhası) durdurur ve hücrenin S fazına(DNA replikasyon safhası) geçişini engeller. Normalde S fazına geçişte CDK kinazlar ve siklinler, Rb proteinlerini inhibe ederek hücre döngüsünün devamlılığını sağlarlar. Ancak p21 aracılığıyla inhibisyonundan kurtulan Rb proteinleri G_1 ' den S fazına geçiş için gerekli diğer bir transkripsiyon faktörü olan E2F' yi inhibe ederler ve bu durum; hücre döngüsünün G_1 fazında durması (hücresel yaşlanma) yada DNA hasar tamiri yapılamadığı takdirde hücrenin ölümüyle (apoptoz, otofaji) sonuçlanır.^{77,78} (Şekil 1)

Oksidatif stres, yaşlanmayla ilişkili sinyal yollarının pek çok basamağında olaya katılır. ROS'ların DNA hasarına neden oluşu ve yüksek seviyelerdeki oksidatif stresin yine p53 yolağı üzerinden gerçekleşen telomer kısalmasını kolaylaştırması oksidatif stres ve yaşlanma ilişkisini güçlendirmektedir.^{77,78,79} Hücresel yaşlanma, replikatif yaşlanma yada prematür yaşlanma farklı stresörler tarafından indüklenseler de altta yatan ortak etyoloji DNA hasarıdır. Dolayısıyla ROS oluşumunu arttıracak herhangi bir olgu eninde sonunda yaşlanmayı indükleyecektir. İlerleyen yaşla beraber DNA hasarları da birikerek yığılır. Bu hasar birikimi yine yaşla beraber artan ROS üretimi ve DNA tamir mekanizmalarındaki yetersizlikle ilişkilendirilmektedir. Başlangıçta hücresel düzeyde gerçekleşen DNA hasarı, hücresel yaşlanma yada apoptozla sonuçlanırken zaman içinde artarak doku düzeyindeki homeostazisi de bozar. Dolayısıyla yaşlanmanın fenotipik özelliği eninde sonunda sistemik/organizmal düzeye ulaşır.

Akbulut ve arkadaşları yaşlı sıçanlarda, beyin karaciğer, mide ve akciğer gibi farklı dokularda lipid peroksidasyon ürünlerinin artarken, antioksidan olarak görev yapan GSH düzeylerinde ise azalma olduğunu göstermişlerdir.^{76,80,81} Yaşlanmayla ilişkili olarak Alzheimer ve Parkinson gibi bir çok nörodejeneratif hastalık, kanser ve bazı kardiyovasküler, metabolik (diyabet) hastalıkta da ROS'lara bağlı oksidatif hasar artışı gösterilmiştir.⁸² Nörodejeneratif hastalıklarda hipokampus, frontal korteks ve limbik vb bölgelerde kademeli nöron kaybı,⁷⁴ GSH, GSH reduktaz, GSH-S tranferaz, SOD, katalaz, tiyoredoksin reduktaz gibi antioksidan enzimlerin azaldığı, lipid peroksidasyon ürünleri, protein oksidasyonu ve nitrasyonunun ise arttığı gösterilmiştir.^{75,76}

Gen ekspresyonları değiştirilmiş farklı hayvan modellerinde major antioksidan enzimlerin yaşam süresine etkisi incelenmiş; ancak çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Sohal ve Orr, Cu/Zn-SOD ve katalazın birlikte aşırı ekspresyonlarının Drosophila'da yaşam süresini %34 uzattığını ancak; ilerleyen çalışmalarında SOD ve katalazın ayrı ayrı aşırı ekspresyonlarının aynı etkiyi açığa çıkarmadığını belirtmiştir.⁸³ SOD ve katalaz düzeyi artmış olan Age-1 mutant Caenorhabditis elegans'larda da yaşam süresi iki katına çıkmaktadır.⁸⁴ Ayrıca EC-SOD (ekstraselüler SOD: SOD3)' un insan fibroblastlarında telomer kısalmasını yavaşlattığı dolayısıyla yaşam süresinin uzamasına etki edebileceği de ifade edilmektedir.⁸⁵

Daha yakın dönem çalışmalara bakıldığında Mn-SOD, glutatyon peroksidaz-1 knockout farelerde kanser insidansında ve oksidatif hasar düzeyinde belirgin bir artış görülürken yaşam süresini kısaltmaya yönelik belirgin bir etkinin ortaya çıkmadığı belirtilmektedir.⁸⁶ Ayrıca SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi çeşitli majör antioksidanların farelerde

aşırı ekspresyonlarının yaşam süresini uzatmadığını belirten çalışmalar mevcuttur.^{87,88} Enzimatik antioksidanların yanı sıra insanlarda antioksidan vitaminlerin kullanımının oksidatif stresle başa çıkmadaki rolü de henüz net değildir.

Şu an için yaşam süresini uzattığı bilinen tek manipülasyon kalori kısıtlamasıdır. Uzun süreli kalori kısıtlaması, esansiyel besinler yeterli olmak kaydı ile, mayalardan memelilere kadar birçok canlıda yaşam süresini uzatır, yaşlanma sürecini yavaşlatır ve yaşa bağlı olarak görülme sıklığı artan hastalıkları azaltır. Son çalışmalarda kalori kısıtlamasının yaşlanmayı geciktirici etkisini, nöroenezisi stimule edip, inflamasyonla ilişkili gen ekspresyonunu ve strese karşı cevabı azaltarak sağladığı belirtilmiştir. Ayrıca kalori kısıtlamasının ROS'ların üretimini azalttığı ve bu sayede oluşabilecek oksidatif hasarı da minimize ettiği bildirilmektedir.⁸⁹

2.3. Apoptoz

Apoptoz programlı ve fizyolojik ölüm şekli olup, hücre sayısının kontrolü, hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengeyi sağlar. Apoptoz kavramı ilk kez 1972'de Kerr Wyllie tarafından⁴ nekrozdan farklı⁹⁰ olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır. Bu günde bu terimin kullanımı uygundur ve fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümünü ifade eder.

Apoptoz normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybindan sorumludur. Apoptozun başlıca amacı yetişkinde hasarlı, enfekte yada potansiyel neoplastik hücreleri yok ederek homeostazın devamlılığını sağlamaktır. Apoptotik hücre sayısı kişinin yada organizmanın sağlıklı yada hasta oluşunu belirlediğinden apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur.⁹¹ Apoptozun normalden çok oluşu Alzheimer, ALS, Parkinson ve musküler atrofiler gibi nörodejeneratif hastalıklara, hematolojik, otoimmün bozukluklara, iskemik hasarlara, bakteriyel ve viral enfeksiyonlara ve toksinlere bağlı hastalıklara yol açar. Diğer taraftan yetersiz apoptoz ise kanser, premaling hastalıklar, otoimmün ve metabolik bozukluklar, viral enfeksiyonlar ve ateroskleroza neden olur.

2.3.1. Apoptozun Organizmada Rol Oynadığı Süreçler

Apoptotik yol çok sayıda fizyolojik, adaptif ve patolojik olayda kullanılır. Apoptoz tek hücreli organizmalarda hücre ölümünün tek yoludur, çok hücreli organizmalarda ise genetik oluşumlu hücre hasarının bloke edilmesi yada hücrenin tamamen yok edilmesi apoptoz vasıtasıyla gerçekleşir. İnsan organizmasında apoptozun izlendiği durumlar:

1. İntrauterin yaşamda organogenez, sinaptogenez
2. Farklılaşmış dokularda olgunlaşma
3. Vücut bütününde hücre sayısının sabit tutulması(dokuda hücre homeostazisi)
4. İmmün sistem reaksiyonlarında defansif olarak
5. Hücrelerin herhangi bir nedenle hasarlanması durumunda
6. Hormon azalmasına bağlı involusyonlarda
7. Tümöral hücre gelişimin baskılanmasında
8. Yaşlanmada
9. Ayrıca hücrelerde hasar oluşturan çeşitli etkenler normalde nekroza neden olurken düşük dozlarda apoptoz da oluşturabilir. (ısı, radyasyon, antikanser ilaçlar, hipoksi vb.)

2.3.2. Apoptozun İndüklenmesi

Apoptozun moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte hücrelerin genetik belleklerinde var olan intihar programının fizyolojik ve patofizyolojik sinyallerle ve oksidatif stres⁹² gibi stres koşulları altında aktifleştigi bilinmektedir. Sinyalizasyonu takiben gerçekleşen apoptoz mekanizması uyarana ve hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir. Sağlıklı bir hücrede de basit hücresel ve moleküler bir olayda herhangi bir anda apoptoza neden olabilir. Ancak her koşulda apoptoz gelişip gelişmeyeceği hücrenin sahip olduğu anti-apoptotik /inhibitörük molekül potansiyeline bağlıdır.

Apoptoz indükleyicileri genel olarak; büyüme faktörleri, onkojenler ve tümör supresör genler olarak üç ana başlık altında toplanabilir. Apoptozun indüklenmesini sağlayan başlıca uyaranlar;

1. Büyüme faktörlerinin geri çekilmesi
2. Sitokinler

3. Hücre içindeki kalsiyum miktarındaki artış
4. TNF-alfa (tümör nekroz faktör)
5. TGF-beta (transforming growth factor)
6. Fas/FasL sisteminin aktivasyonu
7. DNA hasarı sonucu p53 aktivasyonu
8. Viral/ bakteriyel enfeksiyonlar
9. Glukokortikoidler ve onkojenler (c-myc vb.)
10. Oksidatif stres

Ayrıca UV, radyasyon, hipertermi, sitotoksik antikanser ilaçlar ve seramid tedavisi de apoptozun indüklenmesinde rol oynar.⁹¹

2.3.3. Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları

Apoptoz süreci genel olarak 4 aşamada gerçekleşir;

1. Apoptozun başlatılması (sinyal üretici yollar)
2. Hücre içi protezların (kaspazların) aktivasyonu
3. Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması
4. Fagositoz

Apoptoz süreci; hücre dışından ve hücre içinden kaynaklanan sinyaller ile başlatılır. Hücre dışı sinyaller;

- Çevresel yaşam sinyalleri ve büyüme faktörlerinin yetersizliği
- Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (TNF-R ailesinden TNF-R1 ve Fas en bilinenleridir)
- Hücrenin maruz kaldığı dış etkenler (hipoksi, hipertermi, UV, radyasyon, anti-kanser ilaçlar vb)

Hücre içinden kaynaklanan sinyaller ise;

- DNA hasarı
- Hücre içi Ca^{++} miktarındaki artış
- Hücre içi pH'da düşme
- Metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları hücreyi apoptozise götüren ölüm sinyallerini başlatabilmektedir.

Sinyalizasyon sürecini takiben hücre içinde bulunan ve kaspaz adı verilen bir grup proteaz aktive olur. (caspase: cysteine-containing **as**partate spesifik proteases). Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığıyla, iç sinyaller ise mitokondriden serbestleşen Sit-c, Smac ve Omi gibi apoptotik modulatörler aracılığıyla ve farklı zincirleme reaksiyonlar ile sitoplazmadaki efektör kaspazları aktive ederler ve sonuçta hücreyi apoptoza götürürler. Ayrıca mitokondriden serbestleşen Endonükleaz G ve AIF gibi modulatörlerde non-kaspaz yoldan hücreyi apoptotik sürece sokabilir.

Ca^{++} artışında olduğu gibi hücre içi metabolik değişiklikler de hücrenin apoptoz sürecinde rol oynar. Hücre içi artan Ca^{++} düzeyi, inaktif durumdaki endonükleaz, proteaz, transglutamaz, fosfolipaz gibi latent enzimleri aktive ederek apoptozise neden olur.⁹³ Ca^{++} bağımlı proteazlar ve endonükleazların aktifleşmesi sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptozise özgü internükleozomal DNA kırıklarına neden olur.⁹⁴ Ca^{++} bağımlı endonükleazlar DNA zincirini, H1 histon bölgesinden 180-200 baz çifti ve katları uzunluğunda parçalara ayırmaktadır.⁹⁵ Kalsiyum bağımlı nötral bir proteaz olan 'kalpin' ise hücrenin iskelet yapısını bozar.⁹⁶ Lizozomal bir proteaz olan katepsin-D apoptozisin geç evresinde ortaya çıkan bir endopeptidazdır ve lizozomların proteolitik aktivitesinin oluşumunda önemlidir.⁹⁷ Hücre içinde bazı kinazlarda apoptotik süreçte

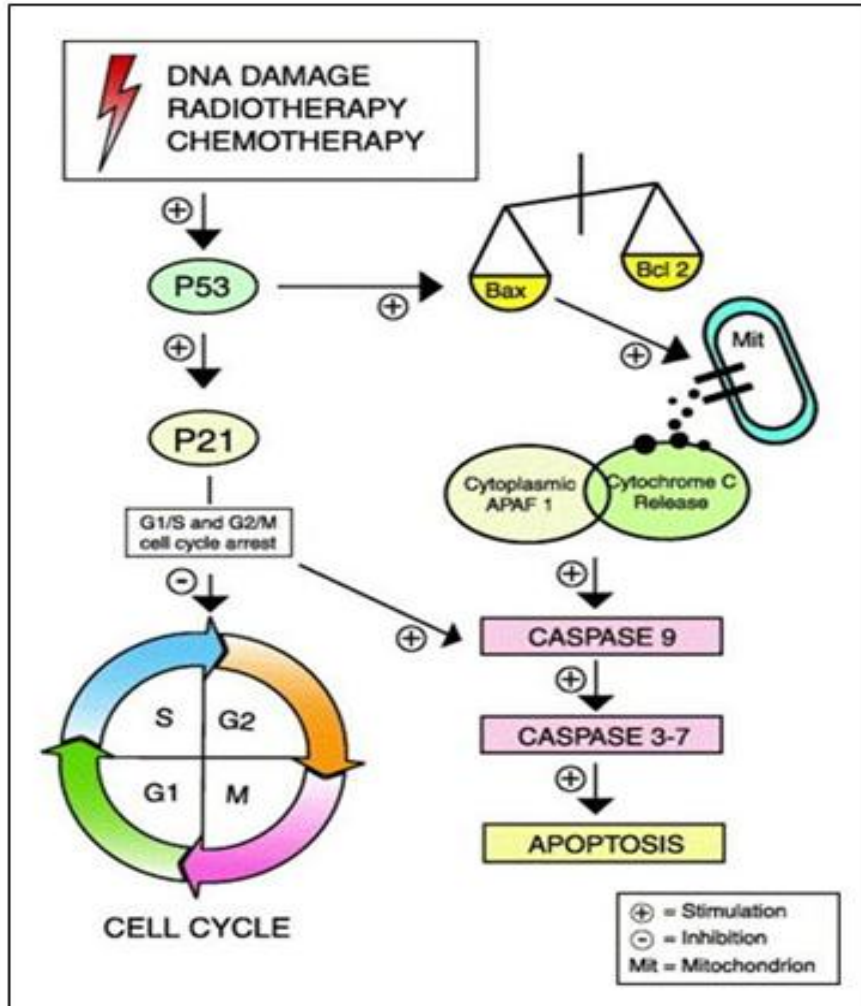
yer alır; örneğin protein kinaz-A apoptozisi uyarırken⁹⁸, protein kinaz-C'nin çoğu izoformu apoptozisi engeller.⁹⁹

Hücrede iç veya dış sinyaller ile DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bazı genler de hücreyi apoptoza götürebilir. Bu genler içinde en iyi tanımlanan p53 geni DNA hasarı ile aktifleşir, ardından oksidatif stres ve yaşlanma konusunda anlatıldığı gibi DNA hasar tamiri için hücre siklusunu durdurur; ancak tamir mümkün olmaz ise bcl-2 ailesinden pro-apoptotik bax proteinini aktive eder ve yine mitokondri aracılığıyla hücrenin apoptozuna neden olur.¹⁰⁰ (Şekil 2)

Hücre içi/dışı sinyallerle oluşan apoptotik uyarı hücre içi farklı sinyal yolları üzerinden kromatin kondensasyonu ve DNA kırıklarının oluşumuna neden olarak hücreyi geri dönüşümsüz bir yola sokar. Hücrede membran, sitoplazma ve nukleus düzeyinde meydana gelen biyokimyasal ve morfolojik değişimler sonuçta hücrenin apoptotik cisimlere ayrılmasına neden olur. Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybederler ve belirgin bir şekilde büzülerek total hacimlerinin neredeyse yarısını kaybederler. Hücresel büzülmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sistemlerin bozulması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin durmasıdır. Dolayısıyla plazma membranının şekli bozulur, kabarcıklanmalar oluşur ve parçalara ayrılarak apoptotik cisimlerin oluşumu sağlanır. Bu evrede transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır.

Apoptozun son aşaması ise apoptotik cisimlerin fagositozudur. Normalde hücre membranındaki ATP bağımlı translokaz enzimi ile aktif olarak korunan fosfolipit asimetrisi apoptozun

indüksiyonunda bozulur. ATP-translokaz enzim aktivitesinin yitilmesi normalde membran iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserinin (PS) membran dış yüzeyine yerleşmesine ve apoptotik cisimlerin çevre hücrelerce tanınarak fagosite edilmesine neden olur. Apoptotik cisimler nekrozdan farklı olarak sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler.⁹⁴



Şekil 2: p53 geninin apoptotik kontrolü

2.3.4. Apoptozun Moleküler Mekanizmaları

Apoptozun moleküler ve genetik detayları ilk kez *C.elegans* nematodunda çalışılmıştır. *C.elegans*' ta programlı hücre ölümünü gerçekleştiren genler Ced-3 ve Ced-4 olarak tanımlanmıştır. Ced-3 geni bir sistein proteazı şifrelemektedir ve memelilerdeki sistein proteazlardan ICE (interleukin 1b converting enzyme)'ye benzemektedir. Ced-4 ise Ca^{++} ma bağlı bir proteini şifrelemekte ve memelilerdeki Apaf-1(Apoptosis protease-activating factor-1) ile homoloji göstermektedir. İnsandaki homoloğu Bcl-2 olan Ced-9 ise apoptozu durdurmaktadır. (Şekil 3)

Vertebralılarda apoptotik yollar kaspaz bağımlı (kaspaz yolu) ve kaspaz bağımsız (non-kaspaz yolu) yollar olarak; kaspaz bağımlı yollar ise intrinsik ve ekstrinsik yollar olarak ikiye ayrılabilir. (Şekil 4) İntrinsik yollar bcl-2 ailesi tarafından düzenlenirken, ekstrinsik yollar ise diğer hücrelerden kaynaklı sinyaller ile şekillenir.¹⁰¹

Kaspaz bağımlı intrinsik(intrasellüler) yollar, mitokondriyal yol yada stres yolları olarak ta bilinir. Hücrenin maruz kaldığı stres koşulları (genomik, metabolik, oksidatif vb) mitokondriyal dış membranın geçirgenliğini değiştirir. Mitokondriyal dış zar potansiyeli Bcl-2 ailesi tarafından düzenlenir. Bcl-2 ailesinin hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri vardır. Ailenin pro-apoptotik üyeleri normalde inaktiftir; ancak çeşitli uyaranlar (büyüme faktörünün uzaklaştırılması Bad'ın, Ca^{++} artışı Bim'im, UV ışın Bmf'nin vb) pro-apoptotik grubun aktifleşmesine ve sonuçta anti-apoptotik Bcl-2'nin baskılanmasına neden olur. Bu sayede Bcl-2'nin inhibisyonundan kurtulan pro-apoptotik Bak ve Bax proteinleri indirek yoldan etkinleşmiş olur ve sonuçta mitokondri dış zarında permeabiliteyi değiştiren geçiş porlarının (bak-bax) oluşumuna, zar potansiyelinin değişimine yol açarlar¹⁰¹. Bak ve Bax proteinleri, aktivatör

proteinler olarak ta bilinen pro-apoptotik Bid, Bim, Puma ve p53 tarafından direk olarak ta aktiveleştirilebilir.¹⁰² Aktifleşen Bak ve Bax'ın hetero/homo oligomerizasyonun mitokondriyal dış membranda yarattığı değişimler mitokondriyal intermembrandan sitokrom-c (sit-c), Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, endonükleaz G (endo G) ve AIF gibi apoptotik proteinlerin sitoplazmaya salınmasına neden olur. Bu proteinlerden en önemlisi sit-c'nin , sitoplazmada Apaf-1(Apoptosis protease-activating factor-1) ve dATP (deoksi ATP)'ye bağlanmasıyla 'apoptozom' adı verilen aktif bir kompleks oluşur.¹⁰³ Apoptozom öncelikle apoptoz başlatıcı kaspazları (kaspaz 9) ardından da efektör kaspazları (kaspaz 3,7) aktiveleştirir. Sonuçta proteolitik kaspaz aktivitesi DNAzı aktive ederek hücrenin ölümüne neden olur.^{91,101}

Sit-c 'nin yanı sıra yine mitokondriyal intermembrandan salınan Smac (Second mitochondrial activator of caspase) ve Omi (Mammalian serine protease) ise apoptozom üzerinden apoptoz sürecini engelleyen IAP (Inhibitor of apoptosis protein)' ı inhibe ederek apoptozun devamlılığını sağlar.

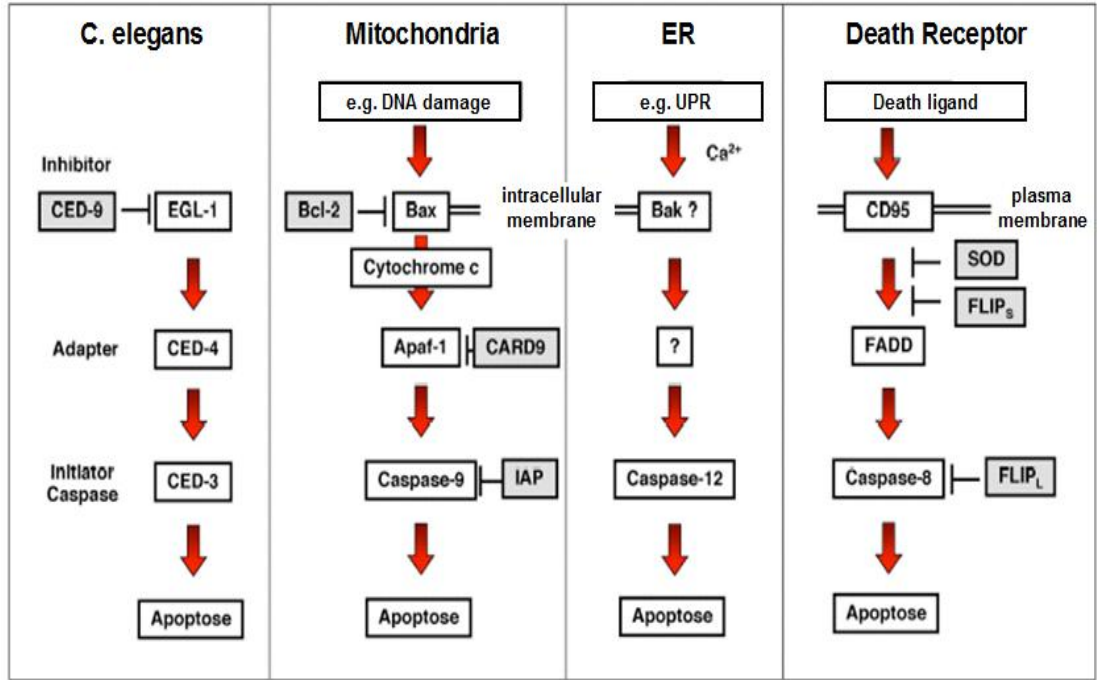
Kaspaza bağlı intrinsik yollarda apoptozu başlatabilen diğer bir organel ise endoplazmik retikulumdur (ER). Protein katlanmasında temel bir işlev yapan ER'nin bu işlevi bozulduğunda katlanmamış proteinlerin yol açtığı bir stres ortaya çıkar. (ER stresi) Bu stresin aşırı olması/uzaması durumunda proteaz ve kinazların doğrudan aktivasyonu ve hücre içi Ca^{++} 'nın artışıyla mitokondriyal yolu aktive eden bir etki oluşturur.¹⁰⁴ Hücrede ölüm/sağkalım kararının verilmesinde ER'nin mitokondri-bağımlı ve mitokondri-bağımsız (kaspaz 12) yollar üzerinden etkinliğini gösterdiği düşünülmektedir.¹⁰⁵ (Şekil 3)

Kaspaza bağı ekstrasik apoptotik yol ise, ölüm reseptör yolu olarak bilinir. Bu yolun sinyalizasyonu ölüm reseptörleri adı verilen transmembran reseptörleri ve reseptörün ilgili ekstrasellüler ligandı ile etkileşimi ile gerçekleşir. Apoptozda rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup TNFR ailesidir. Bu reseptörlerin biyolojik etkileri çeşitlidir ve apoptozla sınırlı değildir. TNFR ailesi içinde apoptozla ilişkili en iyi tanımlanmış reseptörler Fas (CD95, APO-1) ve TNFR1' dir. Fas ligandın(FasL), Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası Fas adaptör proteinle (FADD: Fas-associated death domain protein) birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini oluşturur (DISC: Death-inducing signaling complex). Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları başlatıcı kaspazları (kaspaz 8,10), başlatıcı kaspazlarda efektör kaspazları (kaspaz 3, 7) aktive ederek apoptoza neden olur. TNFR1 reseptörü içinse DISC kompleksi TNF + TNFR1 + TRADD şeklinde oluşur. Ancak Fas reseptörünün aksine, TNFR1'in TRADD'la etkileşimi her zaman apoptozla sonuçlanmaz. TRADD sonrasında FADD ile birleşirse başlatıcı kaspazları aktive ederek hücreyi apoptoza götürür; ancak FADD yerine başka adaptör proteinlere bağlanırsa NF_κB transkripsiyon faktörü etkinliği ile hücre canlılığını devam ettirebilir.¹⁰⁶

Ekstrasik yolda DISC kompleksi aracılığıyla aktiveleşen başlatıcı kaspazlar (kaspaz 8,10) efektör kaspazların yanı sıra bcl-2 ailesinden Bid'i aktif forma (tBid) dönüştürerek mitokondriyal membranda bax/bak oligomerizasyonunu sağlar. Bu sayede ekstrasik kaspaz yolu Bid aracılığıyla intrinsik kaspaz yolunu da aktive edebilir.¹⁰¹

CTL (Sitotoksik T lenfositler) ve NK (natural killer) hücreleri aracılığıyla gerçekleşen perforin/granzim sistemi de ekstrasik yolda yer

alır. Bu sitotoksik hücreler hedef hücrelerin membranlarında perforin ile porlar oluşturarak, stoplazmalarına Granzim B salgırlar. Granzim B hedef hücrede kaspaz aktivasyonu (kaspaz 3,7) yaparak hücrenin apoptozuna neden olur. Ayrıca Granzim B'nin Bid'i aktif tBid formuna dönüştürerek yine mitokondriyal yoldan hücre ölümüne yol açtığı da gösterilmiştir.¹⁰⁷



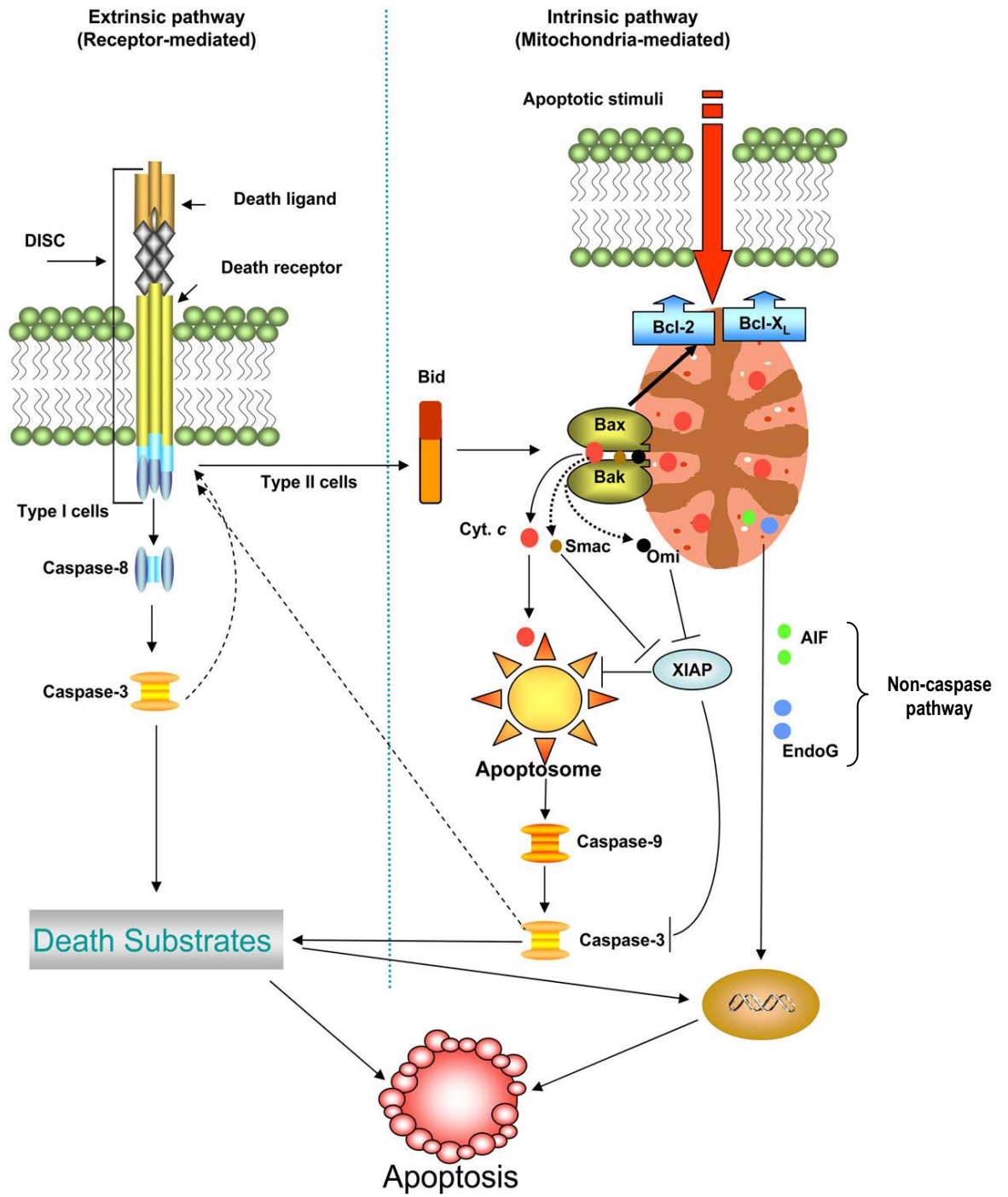
Şekil 3: C.elegans, mitokondri, ER ve ölüm reseptörleri düzeyinde gerçekleşen kaspaza bağlı apoptotik yolların homolojileri

UPR: Unfolded Protein Response

Apaf-1: Apoptosis protease-activating factor-1

FADD: Fas-associated death domain protein

IAP: Inhibitor of apoptosis protein



Şekil 4: Kaspaz bağımlı intrinsik ve ekstrinsik yollar

2.3.5. Bcl-2 Ailesi

Apoptotik sürecin kontrolünde rolü en iyi tanımlanmış olan Bcl-2 (B cell lymphoma/leukemia-2) 24-26 kDa'luk protein kodlayan bir proto-onkogendir. Bcl-2 gen ailesi üyeleri yapısal ve fonksiyonel karakteristikleri açısından pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeleri olmak üzere iki ana sınıfa ayrılabilir¹⁰¹. (Tablo 7)

Tablo 7: Bcl-2 ailesinin sınıflaması

Bcl-2 AİLESİ	BH bölgeleri	Aile üyeleri
Anti - Apoptotik	BH 1-4	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1, Boo...
	BH 1-3	Mcl-1 (myleoid cell leukemia factor 1)
Pro - Apoptotik	BH 1-3	Bax, Bak, Box....
	Sadece BH 3	Hrk, Bid, Bim, Bmf, Puma, Noxa, Bad, Bik...
	BH 3 ve BH 4	Bcl-xs

Bcl-2 aile üyeleri birkaç α -heliks yumağını içeren benzer protein yapısı içerirler. Bunlar 4'e kadar numaranmış BH bölgeleri (Bcl-2 homology domains) olarak adlandırılır. Bcl-2 ailesinin apoptotik veya anti apoptotik etkileri yapılarında bulunan iki bölge; hidrofobik cep ve amfipatik α -heliks e bağlıdır. BH1-3 bölgeleri hidrofobik cebi oluşturur. Amfipatik α -heliks ise BH3 bölgesinde yer alır. Bcl-2 aile üyeleri genelde BH 3 bölgelerinden birbirlerine bağlanıp homo- yada heterodimer yapılar oluşturarak etkinliklerini gösterirler.^{108,109} Hücredeki pro- ve anti-apoptotik proteinlerin oranı hücrenin sağkalımı yada ölümünün belirleyicisi olur. Anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL, sitoplazmik Bax ve mitokondrial dış membrandaki Bak ile heterodimer yapıda kalarak Bak/Bax'ın mitokondrial

membranda oligomer oluşturmalarını engeller, dolayısıyla mitokondrial membran permeabilizasyonunu kontrol ederler. Bak ve Bax'ın aktivasyonuna ilişkin direk ve indirek model olmak üzere iki model önerilmiştir.^{102,110} Direk modele göre yapısında sadece BH3 içeren proapoptotik bcl-2 aile üyeleri (Bid, Bim, Puma vb) direk olarak Bax ve Bak'ın oligomerizasyonunu, pore formasyon değişimini uyarmaktadır; indirek modele göre ise BH3 içeren proapoptotik üyeler Bcl-2' yi inhibe ederek indirek yoldan Bax ve Bak'ı aktiveleştirmektedir. Sonuçta her iki modele göre de mitokondrial membranda Bak/Bax oligomerizasyonunun gerçekteşmesi membranda porların oluşumu, permeabilite artışı ve mitokondrial membrandan sit-c gibi apoptotik proteinlerin salınmasına neden olacak ve hücreyi ölüme götürecektir.

Anti-apoptotik ve aynı zamanda anti-oksidan olarak ta bilinen Bcl-2, dağılımı hücre tipine göre değişkenlik gösteren bir hücre içi membran proteinidir. Bcl-2, reaktif oksijen türlerinin en fazla yapıldığı yer olan mitokondrial dış membran ve onun yanısıra ER ve nükleus zarında da yer alır. Mitokondrial yerleşke gösteren Bcl-2'nin yarattığı etkilere paralel olarak nükleer membrana yerleşik Bcl-2; p53, NFκβ, AP1, CRE, NFAT gibi transkripsiyon faktörlerinin nükleustaki etkinliklerini kontrol eder, ER'de yerleşke gösteren Bcl-2 ise hücrenin hem apoptotik hem de normal fizyolojik süreçlerinde intrasellüler Ca düzeyinin düzenlenmesinde rol oynar.¹¹¹ Bcl-2' nin

- Hematopoetik, lenfoid ve fibroblastik hücrelerde büyüme kaybı
- Nöronlarda nörotrofik faktörlerin olmaması
- UV, γ-radyasyon
- Isı şoku (heat shock)
- Bazı sitotoksik lenfokin tipleri (TNF)
- Kalsiyum iyonoforları
- Bazı virüs tipleri

- L- glutamat gibi uyarıcı nörotransmitterler
- Serbest radikal yapımını uyararak ajanlar ile oluşan hücre ölümünün engellediği gösterilmiştir.

Bcl-2' nin bu ve benzeri koruyucu fonksiyonları;

- Anti-apoptotik fonksiyonu için gerekli eşleşme proteinlerinin yokluğu
- Bcl-2'nin inhibisyonuna neden olan proteinlerin yüksek düzeyde bulunması
- Bcl-2'nin işlevini bozan çeviri sonrası (post-translational) değişikliklerin uyarılması durumunda yetersizleşir.

Bcl-2'nin antioksidan özelliklerine ilişkin lipid peroksidasyonu azalttığı, glutatyon tükenmesi ve H_2O_2 ' yıkıcı etkilerinin neden olduğu apoptotik ölüme karşı direnç sağladığı bilinmektedir.¹¹² Bcl-2'nin bu özelliğini direkt bir anti-oksidan gibi davranarak, redoks-aktif metalleri şelatlayarak ya da ROS üretiminin azaltılmasını sağlayarak gösterdiği düşünülmektedir. Bunların içinde en kabul göreni ise Bcl-2'nin ROS üretimini azaltan bir antioksidan olduğu yönündedir.¹¹³ Çünkü Bcl-2 özellikle ROS'ların en önemli kaynağı mitokondrinin membranına yerleşik bir proteindir ve hücrenin redoks durumundaki değişikliklere de duyarlıdır.

Bcl-2 geninin fazla eksprese edilmesi nöral dokularda olduğu gibi apoptozu önleyerek koruyucu etkilerini gösterirken¹¹⁴; lenfoma, lösemi, prostat, kolon ve mide adenokanserleri, nöroblastoma, renal hücreli kanserler ve melanoma gibi çeşitli insan kanserlerinde de bcl-2 ekspresyonunda aşırı artış görülür.

Doğal yaşlanmada, Hipokampus da dahil beyin farklı bölgelerinde ve farklı organ dokularında bcl-2 ekspresyonu ve miktarının araştırılmasına ilişkin çalışma bulguları çelişkili görünmektedir. Bu durumun, bcl-2'nin hücre (mitotik/postmitotik hücre) spesifik aktivitesi ve hücrenin sağkalım koşullarının farklılığıyla ilişkili olabileceği muhtemeldir.^{115,116,117} Kaufmann ve arkadaşları yaşlı sıçanların hipokampus ve serebellumunda bcl-2 düzeyinin up-regüle olduğunu ve bu up-regülasyonun yaşlanmayla artan oksidatif stres düzeyi ve bcl-2' nin antioksidan karakteri ile ilişkili olabileceğini göstermişlerdir.¹¹⁷ Ayrıca başka bir antioksidan suplementasyonunda bcl-2 up-regülasyonun tersi yönde bozulduğunu da belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise hipokampusta oksidatif stres kaynaklı hücre ölümünde bcl-2 ve bcl-2 mRNA ekspresyonlarının down-regüle olduğu, NAC (N-acetyl cysteine) gibi antioksidan suplementasyonunun ise bu azalışı engellediği gösterilmiştir.¹⁰

2.3.6. Apoptoz ve Oksidatif Stres

Yaşlanmada çeşitli dokularda radikal yapımı artar ve ROS'ların en önemli kaynaklarından biri mitokondridir. Yüksek oksidasyon seviyeleri indirekt olarak hücrel redoks potansiyelini değiştirip GSH, ATP seviyesini ve redükte NAD ve NADPH gibi eşitlikleri azaltır. ROS'lar, antioksidan sistemlerin yetersiz kaldığı durumlarda başta lipidler olmak üzere, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli hücrel bileşenlerde hasara neden olur. Süperoksit ve hidroksil radikali mitokondri, ER ve nükleus membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatarak membran permeabilitesini artırır. Özellikle mitokondriyal membran permeabilitesindeki artış sit-c gibi apoptotik proteinlerin serbestleşmesine neden olarak intrinsik apoptotik yolağı uyarmış olur⁹¹. Oksidatif strese bağlı olarak lizozom, ER gibi diğer organellerde meydana gelen hasarlar, bu organeller ve mitokondri arasında sinyal iletimine ve yine intrinsik yolla

apoptozun uyarılmasına neden olur. Oksidatif strese bağılı olarak gelişen DNA hasarı da p53 geni ve Bax etkileşimi ile intrinsik yolak üzerinden apoptozu uyaracaktır.¹⁰⁰

Radyasyon, proinflamatuvar sitokinlerle tedavi, ısı şoku, büyüme faktörlerinin yoksunluğu gibi ROS oluşturan ekzojen stresörlerin de apoptozu stimüle ettiği bilinmektedir. ROS'ların modifiye ettiği proteinler ve ROS'ların kendisi de intrinsik yolakların yanı sıra, ekstrinsik apoptotik sinyal yolaklarına da iştirak ederler. MAPK kaskadının oksidatif stres altında aktive olması¹¹⁸, oksidatif strese yanıt olarak büyüme faktörü reseptör stimülasyonu ile sinyal yolağının azaltılması ekstrinsik apoptotik sinyal yolaklarının uyarımına örnektir.¹¹⁹ Genellikle oksidatif stresin rol oynadığı apoptoz uyarıcıları Tablo 8' de özetlenmiştir.¹¹⁹

Tablo 8: Oksidatif stresin rol oynadığı apoptoz uyarıcıları

Prooksidanlar	H ₂ O ₂ , diamit,etoposid
İyonize radyasyon	Gama UV radyasyon
Protein sentez inhibitörleri	Sikloheksimid
Apoptotik sinyal	Fas, TNFα, seramid, glutamat
Fizyolojik uyarıcılar	Glikokortikostreoidler, Ca, glutamat, Growth faktör azalması (IL-2, IL-3, nerve growth factor, serum vb)
Patofizyolojik durumlar	IL-2, IL-3, açlık, hiperglisemi, iskemi ve reperfüzyon
Pro-apoptotik genler	p53, Bax, c-myc
Organik solvent ve metabolitler	Benzen ve metabolitleri
Pestisitler	DDT, endosulfan, dieldrin
İlaçlar	Aktinomisin D, sisplatin, taxol

ROS'lar yaşlanmayla ilişkili olarak birçok kronik hastalığın yanı sıra nöronal hücre kaybına ve nörodejenerasyona da sebep olur. ROS'ların hipokampusta LTP (long term potentiation) mekanizmasını bloklayarak nöronal plastisitenin devamlılığına engel olduğu¹²⁰ ve hipokampal nöronlarda bcl-2 proteini ve buna paralel bcl-2 mRNA seviyelerinde ciddi azalmaya neden olduğu gösterilmiştir.¹⁰ Dolayısıyla ROS artışı/uzun süreli oksidatif strese maruz kalınması hipokampal formasyonla ilişkili olarak öğrenme ve bellek oluşumunun bozulmasına hatta nöronal hücre ölümüne neden olarak bu fonksiyonların ilerleyen yaşla beraber yitimine sebep olabilir.¹²¹

Antioksidanlar ise bcl-2 yapımını arttırırlar^{122,123} ve bu molekül serbest radikal temizleyicisi gibi fonksiyon görür^{113,124}. Yaşlanmayla beraber azalan antioksidan kapasite¹²⁵ hasarlı hücrelerin artışına neden olurken, bcl-2 düzeyindeki azalmaya paralel hücre ölümünde artış gözlenir^{10,11}. Çünkü bcl-2 direk bir anti-apoptotik molekül olma karakterinin yanı sıra, reaktif oksijen düzeylerinin apoptoz üzerindeki etkilerini pro-oksidan gibi davranarak ta kontrol eder.^{112,124}

2.3.7. Apoptoz ve Yaşlanma

Yaşlanmayla ilişkili olarak apoptozun arttığı pek çok fizyolojik sistemde gösterilmiştir. Apoptoz, hücrel strese karşı verilen ekstrem bir yanıttır ve çok önemli bir tümör supresör mekanizmadır. Stres altındaki hücrenin yaşlanmaya mı 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. Örneğin, hasarlanmış epitel hücreleri ve fibroblastlar yaşlanma sürecine girme eğilimi gösterirken, hasarlanmış lenfositler ise apoptoza yönelirler.

Apoptoz ve hücrel yaşlanma arasında karşılıklı bir sinyal/haberleşme ağı olduğu düşünülmektedir.⁷⁸

Aşırı oksidatif stres hücrelerin nekroz yada apoptoz yolu ile ölümüne neden olur. Pek çok apoptoz modelinde hücrenin redoks durumunun değişimi kaspaz aktivasyonu ile çevreyi daha okside hale getirir. Çeşitli antioksidanların kullanımı (N asetilsistein gibi) yada kaspaz inhibitörleri apoptozu bloke eder. Bcl-2'nin antioksidan özelliği de apoptoz için potent bir inhibitör olma özelliğine katkıda bulunur.¹¹⁶

Alzheimer, Parkinson, Huntington koresi ve Amyotrofik Lateral Skleroz gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarda hatalı protein üretimi, oksijen radikali yapımında artış, hücre içi Ca artışı gibi mekanizmalarla nöron kaybına apoptozun yol açtığı gösterilmiştir.⁷³ Ayrıca, Fas reseptörü ifadesinin yukarıda sayılan hastalıkların tümünde de artmış olduğu bildirilmektedir.¹²⁶ Yaşlanmayla ilişkili gelişen, kognitif bozukluklar ve demansla karakterize Alzheimer hastalığında beyin atrofisi, hipokampus, frontal korteks ve limbik bölgelerde de kademeli nöron kaybı görülür.⁷⁴ Bunun yanısıra GSH, GSH reduktaz, GSH-Stranferaz, SOD, katalaz, tiyoredoksin reduktaz gibi antioksidan enzimlerin azaldığı, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve nitrasyonunun ise arttığı gösterilmiştir.⁷⁵ Hipokampusta artan oksidatif stresin antioksidan ve antiapoptotik Bcl-2'nin up-regulasyonunu da uyardığı yaşlı sıçanlarda gösterilmiştir. Bu durumun oksidatif strese karşı savunma mekanizması olduğu düşünülmektedir.¹¹⁷ Ancak; hipokampal nöronlarda oksidatif strese maruz kalınan sürenin uzamasıyla, stresin yarattığı nöronal hasarın büyüdüğü, bcl-2 up-regulasyonunun bozulduğu ve sonuçta azalmış bcl-2 düzeyiyle beraber nöronal apoptozun da arttığı gösterilmiştir.¹¹

2.4. Melatonin

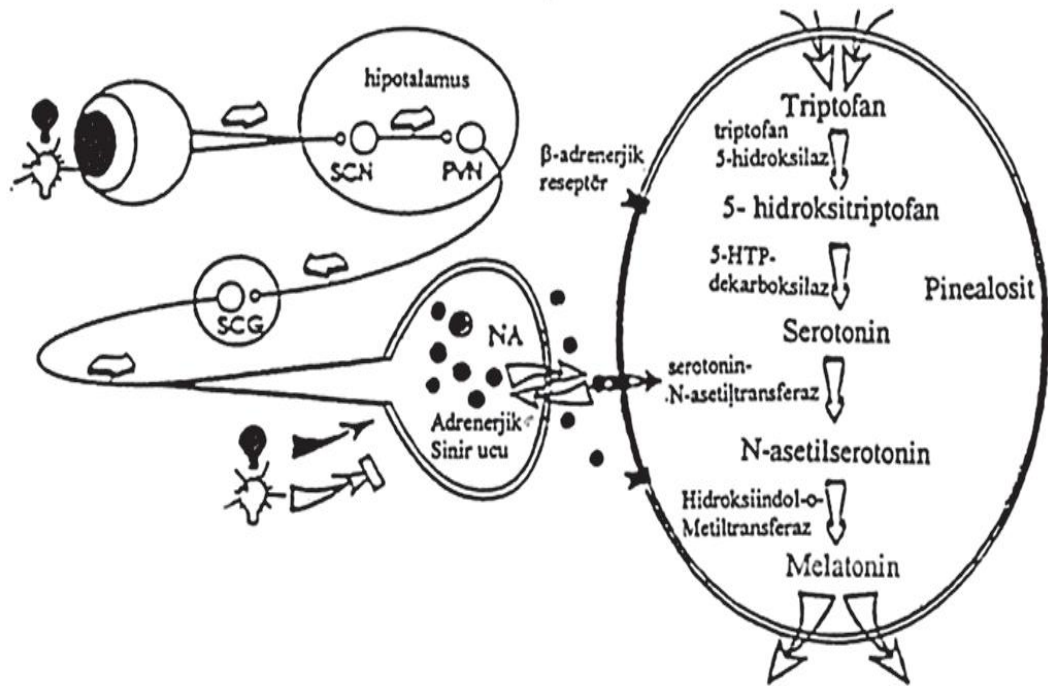
2.4.1. Melatonin Fizyolojisi

Melatonin (N-asetil-5-metoksitripta-min), immünomodülatör, anti-stres ve anti-aging özellikleriyle tanınan ve majör olarak pineal bez hücreleri tarafından salgılanan bir hormondur.¹²⁷ Pineal bez, korpus kallosumun arka kısmının altında, 3. ventrikülün tavanından köken alır ve bir sapla posterior habenüler komissurlara bağlanır. Sapın içinde sinir lifleri bulunmakla birlikte bunlar beze kadar ulaşamaz.

Melatonin iki enzim etkisi ile serotonininden sentezlenir. Enzimlerden biri hız sınırlayıcı olarak ta kabul edilen N-asetil transferaz (NAT), diğeri ise hidroksiindol-o-metiltransferaz (HIOMT) olup, indol halkasının metile edilmesi ile görevlidir. Pineal bezde serotonin miktarı gündüz yüksek gece düşüktür, ışık şiddeti ve süresi bezdeki serotonin miktarını değiştirir. Bezdeki melatonin miktarı ise serotonin ritminin tersi yöndedir; yani melatonin sentezi gündüz az, gece çoktur. Gece serotonin miktarının azalması da melatonin sentezinin artmasından ileri gelir. Geceleri pineal bezde, kanda, serebrospinal sıvıda ve idrarda melatonin miktarı artar. Gece 20.00-23.00 arası yükselen melatonin düzeyi 01.00-05.00 arası doruk değerlere ulaşır ve sabah 07.00-09.00 arasında ise azalmaya başlar. Sağlıklı kişilerde plazma melatonin düzeyi gündüz 0-20 pg/ml, gece 20-200 pg/ml (ortalama 60-70 pg/ml) dir. Bir günde yaklaşık 30 mg (%80 i gece) melatonin üretilir.^{128,129}

Memelilerde melatonin biyosentezi retinada lokalize olmuş fotoreseptörler tarafından düzenlenir. Pineal organ memelilerde endojen dalgalanmanın sürdürülmesi için yeterli değildir. Başlıca osilatör hipotalamusta suprakiazmatik nukleustadır (SCN). SCN' dan uyarılar pineal organa kompleks nöronal zincir yoluyla geçer. Bu zincirin son

halkası süperior servikal gangliondan köken alan sempatik inervasyondur. Pineal bezde ise Norepinefrin, β adrenerjik reseptör aracılığı ile hücre içi cAMP'yi artırır. cAMP, NAT aktivitesini ve dolayısıyla melatonin sentez ve sekresyonunu artırır. (Şekil 5)



Şekil 5. Karanlık/ aydınlık uyarı ile melatonin sentezinin düzenlenmesi

Melatonin, Gastrointestinal kanal, retina, lens, deri, immün ve hematopoetik hücreler, bazı reproduktif organlar ve endokrin bezler gibi ekstrapineal organ ve dokular tarafından da sentezlenir.^{127,130} Ancak melatoninin kanda gün içinde görülen ritmi pineal bezde sentezlenip salınan melatonine bağlıdır. Melatonin beyin, retina, hipofizer bez gibi daha birçok dokuda etkilerini MT1, MT2 gibi hücre membranında yada ROR (tirozin kinaz benzeri orphan reseptör), RZR(retinoid Z reseptör) gibi nukleusta yerleşke gösteren spesifik reseptörler aracılığıyla yada reseptör

aracılığından bağımsız olarak gösterir. Nöral sistemde bulunan melatonin reseptörlerinin(MT1, MT2) de sirkadiyen ritimle çalıştığı gösterilmiştir.¹³¹

Melatoninin ana fizyolojik fonksiyonu, sirkadyen ve mevsimsel döngülerin düzenlenmesi olduğu düşünülse bile melatoninin etkisi yüksek reseptör yoğunlukları olan bölgelerle sınırlı değildir. Sirkadyen düzenlemenin bütünleştirici etkisi vardır. SCN, memelilerin tüm organları üzerinde, direkt ve indirekt kontrole sayısız fonksiyonu ritimler.

MT1 reseptörleri hipokampus, serebellum dahil olmak üzere nöronal yerleşim göstermektedir. Ayrıca SCN, hipotalamus, talamus preoptik alan, retinanın pleksiform tabakası ve serebral korteksin pek çok bölgesinde MT1 reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir.¹³² Nöronal olmayan MT1 reseptörleri, serebral ve caudal arterlerde, hipofizyal pars tuberaliste, ovaryum, böbrek ve ince barsaklarda bulunmuştur. MT2 reseptörlerinin memeli hücrelerinde spesifik dağılımı henüz iyi açıklanmamıştır.¹³¹

2.4.2. Melatoninin Antioksidan Etkileri

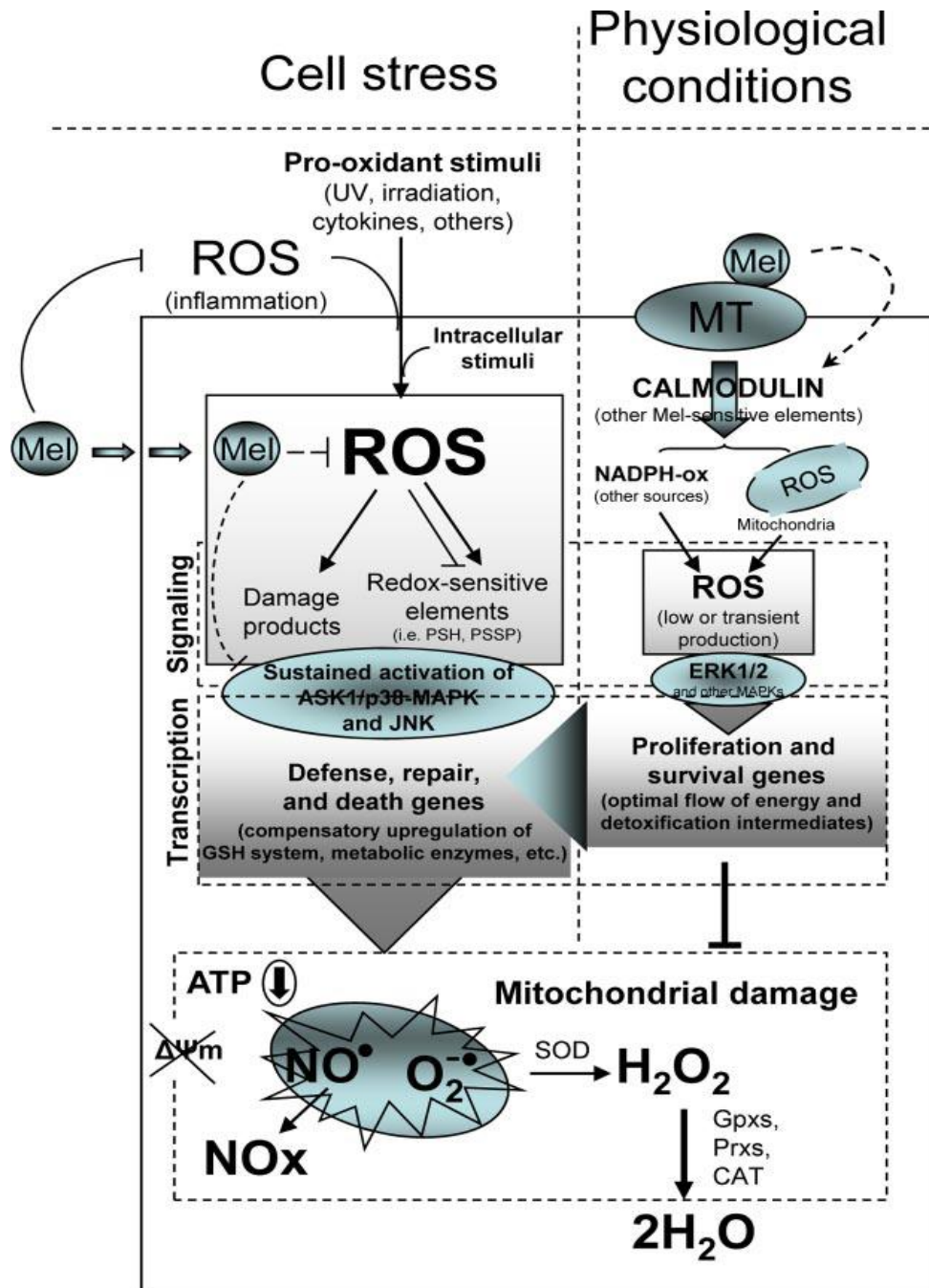
Melatonin, lipofilik ve hidrofilik özelliği ile bütün hücre ve hücre içi kompartmanlardan kolayca diffüze olabilir, kan-beyin bariyerinden kolaylıkla geçebilir. Ayrıca serbest radikal süpürücü etkisi için herhangi bir bağlanma bölgesine ve reseptöre de ihtiyaç duymaz.^{12,13,133} Bu özellikleri ile de üstün bir antioksidan olarak kabul edilir.^{134,135} Ancak ilerleyen yaşla beraber melatonin düzeyi ve buna korele olarak insan serumundaki antioksidan kapasitede de azalma görülür.¹⁴ Melatonin, yapısında bulunan pirol halkası nedeniyle $\bullet\text{O}_2$ ve $\text{OH}\bullet$ radikallerini yakalamada yüksek bir kapasiteye sahiptir. Melatoninin, endojen bir radikal süpürücü olan glutatyondan yaklaşık 5 kat , ekzojen antioksidan

olan mannitolden ise 15 kat daha etkili olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu melatoninin OH radikaline karşı diğer iki önemli antioksidana göre çok daha gl olduğunu göstermektedir. Melatoninin OH radikali ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüştüğü, bununda ortamdaki süperoksit radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir.¹³⁶

Glutasyon ve mannitol gibi iyi bilinen serbest radikal tüketicileri ile melatonin karşılaştırıldığında, melatoninin özellikle DNA gibi makromolekülleri oksidatif hasardan korumada daha güçlü olduğu ortaya çıkmıştır.¹³⁷ Yüksek toksik güce sahip hidroksil radikallerinin tketiciliğinin yanı sıra melatonin, güçlü bir antioksidan enzim olan glutasyon peroksidaz aktivitesini de stimüle eder. Glutasyon peroksidazin metabolik görevi ise hidroksil radikalinin prekürsörü olan hidrojen peroksidi suya metabolize etmektir. Bu nedenle melatonin hücreleri oksidatif hasardan en az iki yolla korumaktadır.¹³⁸

İn vivo ve in vitro çalışmalarda melatoninin reseptör bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla detoksifikasyonu ve strese cevaben oluşan gen ifadelerini (Nf-κB, AP-1, Nrf2) de kontrol ettiği, bu sayede antioksidanların (GSH, GSH-Px vb) ve detoksifikasyon genlerinin ekspresyonlarını stimüle ettiği gösterilmiştir.^{131,138} Melatonin fizyolojik koşullarda calmodulin aracılığı ile az miktarda ROS üretimini sitimle eder.^{139,140} Bu şekilde artan ROS hücre içi ikincil haberci/sinyal molekülü gibi görev yapar ve gen transkripsiyonlarını değiştirerek melatoninin anabolik ve koruyucu etkilerinin açığa çıkmasını sağlar. Yaşlanma, metabolizma artışı yada artmış çevresel stres koşulları altında görülen aşırı ROS varlığında ise melatonin hem kendisi direk ROS'ları süpürücü etkisini gösterir hem de antioksidan kompensatuar mekanizmaları (GSH

sistemi, metabolik enzimler vb) devreye sokar, mitokondrial membran potansiyelini, ATP üretimini kontrol altında tutar. Bu sayede hücreyi mitokondriyal hasara karşı da korur.¹³¹ (Şekil 6)



Şekil 6: Fizyolojik ve stres koşulları altında melatonin ve ROS ilişkisi

2.4.3. Melatonin ve Yaşlanma

Melatonin yaşlanma ile birlikte hem pineal, hem de plazma düzeylerinde gittikçe azalan güçlü bir antioksidandır. Melatoninin salınımı insanlarda 15 yaş civarında maksimum seviyeye ulaşmakta, bu yaştan sonra giderek azalmakta ve 50 yaşın üzerinde ise minimum seviyeye inmektedir. Bu azalmanın da yaşlanma olayının önemli bir sebebini teşkil edebileceği kaydedilmiştir.¹⁴¹ Melatonin düzeyinin azalması ile birçok dokuda guanilat siklaz aktivitesinin azalması¹⁴² sonucu hücre zar kalınlığı ve rijiditesi artar, hücrelere besin girişi ve metabolik artıkların atılımı zorlaşır. Dolayısıyla da bu koşullarda dejeneratif hasar oluşumu hızlanır.¹³⁵ Bütün bunlar aterosklerotik değişiklikleri de içeren yaşlılıkla ilgili birçok sürecin oluşmasına yol açar.

Melatonin, antioksidan özelliği ile serbest radikalleri ortadan kaldırarak oksidatif stresi önler. Yaşlanma ile birlikte melatonin düzeyleri azalırken, oksidatif stres artmaktadır, dolayısıyla yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogenezinde de melatoninin önemli rolü olabileceği düşünülmektedir.^{141,143} Sıçanlarda, uzun süreli ekzojen melatonin kullanımının yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir¹⁴⁴ Ayrıca yaşa bağlı hastalıkların gelişiminde de melatoninin geciktirici rolü olduğu belirtilmektedir.^{143,145}

Şuan için yaşam süresini uzattığı bilinen tek manipulasyon kalori kısıtlamasıdır. Melatonin ve kalori kısıtlamasının yaşlanmayı engelleyici etkileri araştırılmış ve kalori kısıtlaması yapılan sıçanlarda gece salgılanan melatonin miktarı iki kat fazla bulunmuş^{146,147} ayrıca; pineal bezdeki melatonin salınımı yapan adrenerjik reseptörlerin sayısı da kalori kısıtlaması yapılan sıçanlarda iki kat fazla olduğu gösterilmiştir.¹⁴⁸

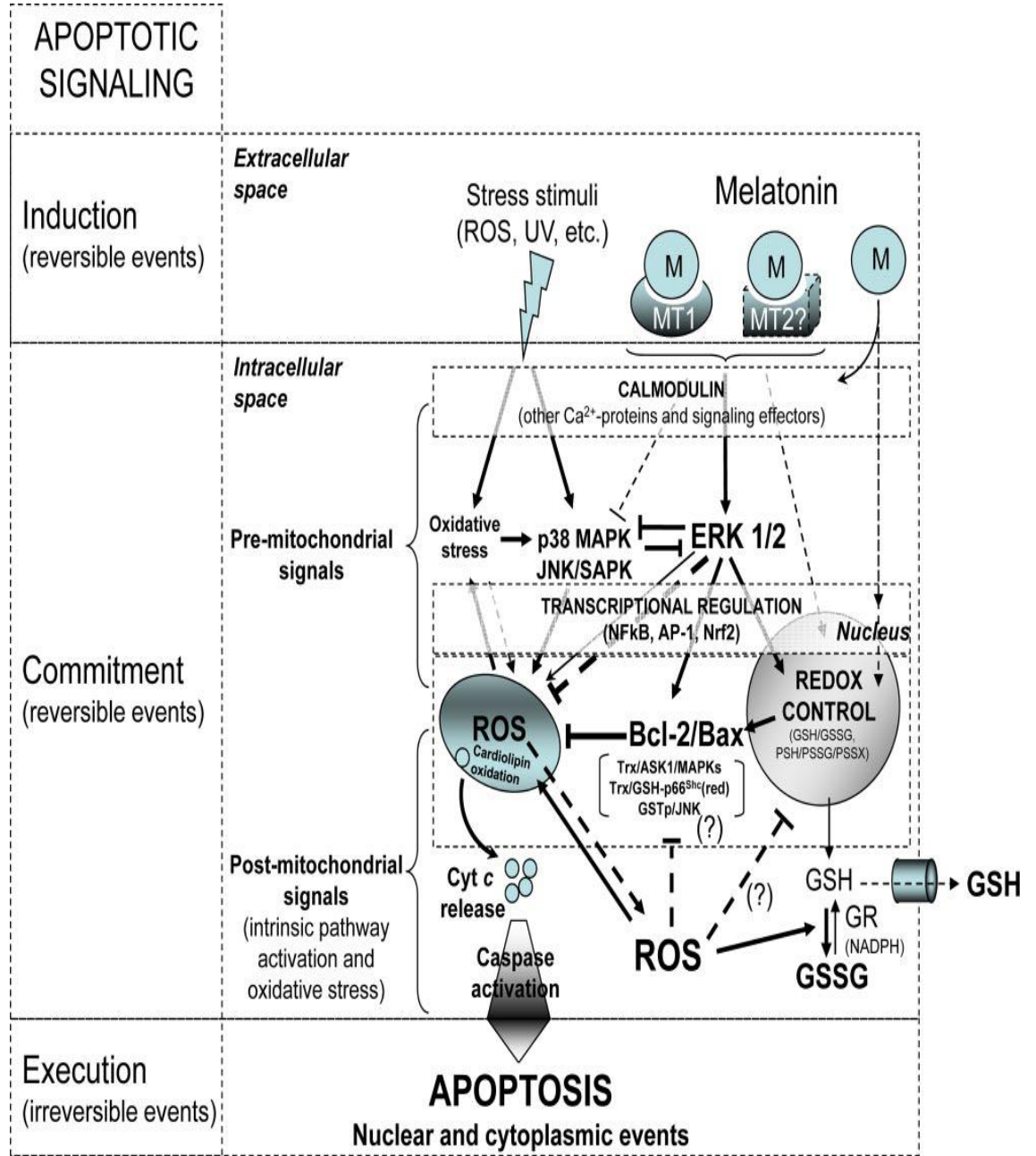
2.4.4. Melatonin ve Apoptoz

Melatoninin apoptozun regülasyonundaki ilk bulgusu Maestroni ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir.¹⁴⁹ Bunu takiben pek çok deneysel çalışmada apoptoz üzerine melatoninin etkileri incelenmiştir ve sonuçlar 3 ana başlık altında toplanabilir;

1. İmmün hücrelerdeki apoptozun inhibisyonu (antiapoptotik etki)
2. Nöronal hücrelerdeki hücre ölümünün önlenmesi (antiapoptotik etki)
3. Kanser hücrelerinde apoptozun hızlandırılması (proapoptotik etki)

Bu başlıklar altında yapılan tüm çalışmalar melatoninin apoptozdaki etkilerinin mekanizmasını, apoptozda oksidatif stresin önemini ve melatoninin antioksidan etkilerinin apoptozdaki rolünü de ortaya çıkarmıştır. Akbulut ve arkadaşları da yaşlanmada melatonin uygulamasının gastrik mukoza hücrelerinde kaspaz bağımlı apoptozu azalttığını göstermişlerdir.¹⁵⁰

Melatonin ve apoptoz arasındaki ilişkiyi açıklayan olası mekanizma özetle şöyledir (Şekil 7)¹³¹. Yaşlanma, metabolizma artışı yada artmış çevresel stres koşulları altında görülen aşırı ROS varlığında melatonin, reseptör bağımlı ve bağımsız yollardan ERK1/2 sinyal yolağını uyarır, Nf-κB, AP-1, Nrf2 gibi transkripsiyon faktörlerini stimülasyonunu sağlayarak antioksidanların ve detoksifikasyon genlerinin ekspresyonlarını artırır. Bu sayede GSH/GSSG oranı, GSH-Px, GSH-Rd, SOD, CAT vb antioksidan enzimler ve beraberinde anti-apoptotik ve anti-oksidan özellik gösteren redoks duyarlı Bcl-2 düzeyi yada Bcl-2/Bax oranı da artırılır. Melatoninin, mitokondriyal hasarı ve mitokondrinin sinyalizasyon fonksiyonlarını kontrol ederek ROS üretimini azalttığı ve anti-apoptotik Bcl-2'nin aktivasyonunu arttırdığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.^{123,151,152}



Şekil 7: Melatonin ve apoptoz ilişkisinin moleküler mekanizması

2.4.5. Melatoninin SSS' deki Yaşlanma ve Nörodejeneratif Olaylara Etkileri

Beyin dokusunun oksidatif hasara oldukça duyarlı olması^{71,72}, yaşlanma ile birlikte makromoleküllerde oksidatif hasar birikimi ve inflamasyon gelişimi melatonin tedavisinin yaşa bağlı SSS fonksiyonlarındaki değişime karşı koruyucu olabileceğini düşündürmüştür. Sıçanlarda melatoninin nöroprotektif özelliğini; beyinde GSH sistemini aktive ederek geliştirdiği antiperoksidatif etkileri ile ortaya çıkardığı Akbulut ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir.^{76,81} Benzer şekilde;

- Spinal kord yaralanmalarında¹⁵³
 - Substantia nigra pars kompakta'nın dopaminerjik hücrelerinin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) ile oksidatif strese maruz bırakılmasında olduğu gibi çeşitli Parkinson modellerinde^{154,155}
 - Orta serebral arter hasarına bağlı iskemi-reperfüzyon modellerinde^{156,157}
 - Neonatal serebellumda geliştirilen fenilketonüri kaynaklı oksidatif stres koşullarında olduğu gibi¹⁵⁸
- çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalarda melatoninin beyin birçok bölgesinde nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir.

Melatonin sekresyonu yaşla bağlantılı olarak azalma gösterdiğinden yaşlanma ile birlikte nöronal apoptozda artış muhtemel gözükmemektedir.^{131,159} Çeşitli hücre modelleri oluşturularak yapılan çok sayıda in vitro çalışma, melatoninin nöroprotektif etkisini; apoptotik sinyal yollarında anti-apoptotik bir faktör gibi davranarak gösterdiğini vurgulamaktadır. Bu modellere;

- Methamfetamin¹⁶⁰, H₂O₂ ve MPP (methyl-phenylpyridinium) 'ye¹⁶¹ maruz bırakılan insan nöroblastoma SH-SY5Y hücreleri

- MPP'ye maruz bırakılan dopaminerjik nöronlar¹⁶²
- Pro-apoptotik aktiviteye sahip, protein sentez inhibitörü puromisin verilen astrositoma glial hücreleri¹⁶³ örnek gösterilebilir.

Yaşlanma ile birlikte sinir sistemindeki gerileme fizyolojik yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olup en iyi gösterge hafıza ve kognitif fonksiyonlardaki kayıplardır. Yaşlanma, ilişkili nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli nörodejeneratif modellemelerde Hipokampus ta dahil beynin birçok bölgesinde antioksidan kapasitede azalma (GSH sistemi, SOD, katalaz vb) buna karşın MDA gibi lipid peroksidasyon ürünlerinde ise artış gösterilmiştir.^{8,9,76,164} Melatonin ise antioksidan özellikleri ile hipokampus ve beynin diğer bölgelerinde nöroprotektif fonksiyon göstermektedir.^{19,165,166}

Yaşlanmayla beraber, nörogezinin en aktif olduğu yerlerden biri olan hipokampusun dentat gyrusundaki NSC (neural stem/progenitor cells) hücrelerinin proliferasyonu ve sağkalım oranları azalmaktadır.^{6,7} Yaşlanma, hipokampal dentat gyrustaki azalan nöron sayısı ve nöroenezle ilişkilendirilirken^{167,168} farelerde yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda melatoninin hipokampal dentat gyrusta nöroenezini uyardığı, projenitör/prekürsör hücrelerin proliferasyonuna direk etki etmediği ancak; sağkalımlarını uyararak yeni doğan hücre sayısını arttırdığı gösterilmiştir.¹⁶⁹ Ayrıca melatonin, postmitotik hücrelerde de koruyucu etkisini göstererek var olan hücre sayısını muhafaza etmeye katkıda bulunur.^{169,170}

Melatonin, hem eksitatorik ve inhibitörük nörotransmitter sistemlerini etkileyerek hem de hipokampal nöronlarda LTP (long term

potentiation) mekanizması ile ilişkili NMDA reseptör aktivitelerini değiştirirerek plastisite üzerine de olumlu etkiler yaratır^{171,172,173} ROS'ların hipokampusta LTP (long term potentiation) mekanizmasını bloklayarak nöronal plastisitenin devamlılığına engel olduğu¹²⁰ ve hipokampal nöronlarda bcl-2 proteini ve buna paralel bcl-2 mRNA seviyelerinde ciddi azalmaya neden olduğu gösterilmiştir.¹⁰ Dolayısıyla ROS artışı/uzun süreli oksidatif strese maruz kalınması hipokampal formasyonla ilişkili olarak öğrenme ve bellek oluşumunun bozulmasına hatta nöronal hücre ölümüne neden olarak bu fonksiyonların ilerleyen yaşla beraber yitimine sebep olabilir.¹²¹ Buna karşın; melatoninin, hipokampusta mitokondriyal hasarı ve mitokondrinin sinyalizasyon fonksiyonlarını kontrol ederek ROS üretimini azalttığı^{172,173} ve homosistein kaynaklı hipokampal hücre ölümünde bcl-2 up-regülasyonu, bax down-regülasyonu ile nöral kaybı önlediği gösterilmiştir.¹⁸

Tüm bunlar göz önüne alındığında orta yaşlardan itibaren melatonin gibi antioksidan desteğinin nöronal kayıp hızını azaltması olumlu bir yaklaşım olacaktır. Diğer taraftan melatoninin lipofilik yapısı sayesinde kan-beyin bariyerini kolayca geçebilmesi ve ayrıca farmakolojik dozlarının hayvanlarda tüm yaşam süresince yada insanlarda uzun periyodlarla uygulanımının herhangi bir toksisiteye yada pro-oksidan etkiye neden olmadığına gösterilmiş olması bu indolün güvenle kullanılabilirliğini desteklemektedir.¹⁵⁹

2.5. Curcumin

Curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)- 1,6 heptadiene -3,5-dione) turmeric'in(curcuma longa) ana komponentidir. Özellikle Güney Doğu Asya'da curcuma longa bitkisinin yumrusundan elde edilir. Yapısındaki diferuloylmethene, köri baharatına sarı rengini veren

maddedir. Curcumin peynirlerde, tereyağı, kozmetiklerde ve daha çok baharatlarda kullanılır.

Curcumin, bir β - diketon bileşiktir yani; β pozisyonunda bağlanmış 2 keton grubu içerir. Lipofilik özellikli bir polifenol olan Curcumin barsaklardan absorbe olurken hidrojenizasyon ile tetrahidrocurcumin (THC)' e dönüşür. Barsaklardan emilimi esnasında kana karışmakta ve tüm dokulara dağılmaktadır. En sonunda THC safra yoluyla atılmaktadır. Hindistan ve Güney Asya da inflamasyonda, cilt yaralarında, karaciğer ve safra kesesi hastalıklarında, öksürük ve birçok tümörde tedavi amaçlı kullanılmaktadır.^{174,175}

Curcuminin oldukça güçlü antinflamatuar, antiproliferatif, antioksidan ve antitümör etkilerinin olduğu bilinmektedir.^{15,16,17} Curcuminin yapısında azid, halopiroksil, Br₂ radikalleri ile birlikte birçok reaktif oksidanla reaksiyona giren fenolik OH grubu yer alır. Antioksidan etkisi, fenolik yapısından ve β diketon türevinden ileri gelir. Curcumin bu özellikleri ile oksidatif DNA hasarını inhibe eder, lipoksijenaz ve siklooksijenaz inhibisyonu sonucunda araşidonik asit salınımı azaltır. Ayrıca NF κ B aktivasyonunu inhibe edip antiinflamatuar etki oluşturur, TNF α , IL-1, granulosit koloni stimulan faktör miktarını arttırır.^{175,176} Curcuminin, büyümesi inhibe edilmiş hücreleri restore ederek apoptozu engellediği bilinmesine karşın, kemopreventif etkisiyle kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği düşünülmektedir. Curcuminin insan hepatoma ve lösemi hücrelerinde apoptozu uyardığı ve insan bazal hücre karsinom hücrelerinde apoptoz oluşturduğu bildirilmiştir. Çalışmalarda curcuminin kaspaza bağlı apoptozu inhibe ettiği, NF κ B ve COX2 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir.¹⁷⁷ Curcumin sitokrom P450 potent inhibitörüdür ve

glutasyon S transferaz aktivasyonu ile potansiyel kanser koruyucu bir ajandır.¹⁷⁸

Birçok in vivo ve in vitro çalışmalarda^{20,179,180,181} farklı organlardaki yaşlanma, kanser ve çeşitli oksidatif stres koşulları altında Curcuminin, lipit peroksidasyonu inhibe ettiği ve antioksidan (SOD, GSH, GST ve GPx) aktiviteyi artırdığı gösterilmiştir. Curcuminin, antioksidan ve nöroprotektif etkileri yaşlı sıçanların korteks, hipokampus, serebellum gibi farklı beyin bölgelerinde gösterilmiştir.²⁰ Curcumin yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli toksik koşullar altında da hipokampusta SOD, GSH, GST ve GPx gibi antioksidan enzim düzeylerini artırırken; lipit peroksidasyon ürünlerini (MDA) azaltmaktadır.^{20,182,183} Curcuminin nöroprotektif etkileri ile hipokampal nörojenezi uyardığı¹⁸⁴ bcl-2 ekspresyonunu artırarak hipokampal hücre ölümünü azalttığı, dolayısıyla da öğrenme ve bellek işlevlerini geliştirdiği gösterilmiştir.²¹

2.6. Hipokampus

Filogenetik olarak en eski beyin kısımlarından birisi olan hipokampus, insanda lateral ventrikul alt boynuzunun tabanında bulunur. Kesitlerde C harfi şeklinde olan bu yapı ortalama 5 cm uzunluğundadır. Görünümü itibariyle denizatına benzetildiğinden hipokampus adı verilmiştir.^{185,186}

Algı ve bellek sistemleri arasında bağlantı kuran hipokampus, beynin birçok bölgesinden duyu lifleri almaktadır. Aldığı bu duyuları, forniks aracılığıyla hipotalamus, talamus ve septal sahaya iletmektedir. Bunun yanı sıra, hipokampus subkortikal alanlarla olan bağlantısı sayesinde, beynin birçok bölgesi ile iletişim halindedir. Bellek ve

nöral plastisitenin oluşumunu sağlayan LTP(long-term potentiation) mekanizmaları da ilk kez hipokampusta çalışılmıştır. Öğrenme ve hafıza fonksiyonları üzerinde önemli role sahip olan hipokampus, yeni elde edilen bilgilerin depolanması ve anıların kısa süreli hafızadan uzun süreli hafızaya geçirilmesinde görev alır. Bu nedenle hipokampusta meydana gelebilecek bir hasar, belirtilen fonksiyonlarda bozukluklara neden olabilir. Nitekim hipokampus lezyonlarında, anıların kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe alınmasında sorun olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, verbal veya sembolik anıların hafızada tutulmasının da mümkün olamayacağı ifade edilmistir.^{186,187}

Alzheimer gibi yaşlanma ve nörodejenerasyona bağlı gelişen hastalıklarda ilk önce etkilenen bölgelerden biri hipokampustur ve dolayısıyla öğrenme-bellek bozuklukları başta olmak üzere motor becerilerde de oryantasyon bozuklukları sık gözlenen semptomlardır.¹⁸⁸

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışma 30.06.2011 tarih ve G.Ü.ET-11.055 kod numaralı etik kurul kararı ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Wistar Albino cinsi, başlangıç yaşları 13 aylık (orta yaşlı) olan, 30 adet erkek sıçan kullanıldı. Çalışmada kullanılan tüm denekler laboratuvar ortamında 12 saat aydınlıkta ve 12 saat karanlıkta olacak şekilde normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile beslendi. Bu düzenleme otomatik çalışan bir zaman saati ile sağlanmıştır.

Deneklerin temini ve bakımları G.Ü. Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel araştırmaları Merkezi (GÜDAM) tarafından sağlanmıştır.

Çalışmamız için her grupta 6'şar adet sıçan yer alacak şekilde 5 grup oluşturuldu. Tablo 9' da gösterildiği üzere ilk iki grup kontrol grubu olarak belirlendi. Birinci kontrol grubuna subkutan (sc) Phosohate Buffered Saline (PBS) (%1'lik etanollü), ikinci kontrol grubuna ise Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 100µl/bw olacak şekilde intraperitoneal (ip) enjeksiyon yapıldı. Deney grupları ise şu şekilde oluşturuldu; 3. gruba %1lik etanollü PBS çözeltisi ile hazırlanan melatonin (MEL) 10mg/kg dozajda sc olarak, 4. gruba DMSO ile hazırlanan curcumin (CUR) 30mg/kg olacak şekilde ip

yolla enjekte edildi. 5. gruba ise MEL (10mg/kg, sc) ve CUR (30mg/kg, ip) birlikte verildi. Tüm grupların enjeksiyonları bir ay süre ile her gün saat 17:00 da yapıldı.

Sıçanlar 30 günlük enjeksiyon uygulamasını takiben enjeksiyonun yapılmadığı 31. günde intramusküler olarak uygulanan % 10'luk ketamin-%2'lik ksilazin anestezisi altında dekapite edilerek deney sonlandırıldı.

Dekapitasyon işlemini takiben buz paketleri üzerinde beyin dokusu çıkartıldı ve hipokampusları izole edilerek sıvı azot içersinde derhal donduruldu. Elde edilen numuneler analizlerin yapılacağı süreye kadar -80°C deki derin dondurucuda muhafaza edildi.

Deneklerin izole hipokampuslarından hazırlanan örneklerde çalışılan parametreler MDA, GSH düzeyleri ve bcl-2 proteininin tayinidir. Lipit peroksidasyonu ile paralel değişim gösteren ve dokudaki radikal hasarın da göstergesi kabul edilebilecek MDA düzeyini belirlemek için Tiobarbitürik asit reaktif (TBARS) madde oluşumu yöntemi,⁶⁵ antioksidan kapasitenin göstergesi olarak kabul edilen GSH'ın tayini içinse modifiye Ellman yöntemi kullanıldı.¹⁸⁹ Hipokampus dokusundan elde edilen hücre lizatlarındaki protein miktarının ölçümü Bradford protein tayin metodu ile yapıldı.¹⁹⁰ Hazırlanan lizatlardaki bcl-2 ve yükleme kontrolü için tercih edilen b-actin proteininin gösterilmesinde ise proteinlerin moleküler büyüklüklerine göre ayrıştırılması prensibine dayanan Western Blott tekniği kullanılmıştır.^{191,192}

Tablo 9: Deney grupları ve özellikleri

GRUPLAR	DENEK SAYISI	UYGULAMA	DOZAJ	VERİLİŞ ŞEKLİ	BAŞLANGIÇ AĞIRLIKLARI (GR)
1 (kontrol)	6	PBS (+ETANOL)	---	sc	356,5±15,01
2 (kontrol)	6	DMSO	100µl/bw	ip	345,5±12,82
3	6	MEL (+PBS+ETANOL)	10mg/kg	sc	378,0±8,86
4	6	CUR (+DMSO)	30mg/kg	ip	354,57±15,14
5	6	MEL (+PBS+ETANOL)	10mg/kg	sc	364,12±11,14
		CUR (+DMSO)	30mg/kg	ip	

3.1.2. Kullanılan Malzeme ve Aletler

Santrifüj: MPW-350(soğutma sistemli)

Sonikatör: Sonics vibrocell

Spektrofotometre: BİOKİT EL x 800 Bioelisa Reader

Elektroforez ve Blotting: Bio-Rad mini protean system

Güç kaynağı: Consort E 835 Electrophoresis Power Supply

Isıtıcı: Eppendorf Thermomixer Compact

Hassas tartı: SARTORIUS Basic

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

TBARS ve GSH tayininde kullanılan kimyasallar Sigma Chemical Company'den, western blot uygulaması için kullanılan kimyasallar ise Santa Cruz Biotechnology'den temin edilmiştir. Antikor seçimleri, antikorların dilüsyon oranları ve diğer malzemelerde Tablo 10' da belirtildiği gibidir.

Tablo 10: Deneyde kullanılan antikorlar ve diğer malzemeler

Ürün	Temin edilen firma
Melatonin	Sigma M 5250-1G
Curcumin	Sigma C 1385-5G
Bcl-2 primer antikor	Santa Cruz; Bcl-2 (C21), sc-783 rabbit polyclonal, IgG, Lot: K1511 (1:500)
Bcl-2 sekonder antikor	Santa Cruz; sc-2030, goat anti-rabbit, IgG- HRP, Lot: K0811 (1:5000)
b-actin primer antikor	Santa Cruz; b-actin (R22), sc-130657, rabbit polyclonal, IgG,(1:250)
b-actin sekonder antikor	Santa Cruz; sc-2030, goat anti-rabbit, IgG- HRP, Lot: K0811 (1:5000)
Homojenizasyon tamponu	İntron Biotechnology; Pro-Prep Protein Extraction Solution (cat:17081)
Protein markerı	İnvitrogen; SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard LC5925 Lot: 943155
Nitrosellülöz membran	Bio-Rad; 162-0112
Kemilüminesans kit	İnvitrogen; ECL Novex HRP chemiluminescent-substrat reagent kit (WP 20002),
BSA (bovine serum albumin)	Bioshop; ALB003.25
Bradford çözeltisi	Bioshop; Bradford reagent cat: BRA222.500

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

Lipit Peroksidasyonu tayini için kullanılan çözeltiler:

- TCA çözeltisi (% 10): 10 gr TCA tartılıp, son hacim 100 ml olacak şekilde distile suda eritildi.
- TBA çözeltisi (% 0.67): 0.67 gr TBA tartılıp, son hacim 100 ml olacak şekilde distile suda eritildi.
- BHT çözeltisi (%1): 1 g BHT tartılıp son hacim 100 ml olacak şekilde %95' lik etanolde eritildi

GSH tayini için kullanılan çözeltiler:

- TCA çözeltisi (% 10): 10 gr TCA tartılıp, son hacim 100 ml olacak şekilde distile suda eritildi.
- Na_2HPO_4 çözeltisi (0,3 M): 8,5176 g Na_2HPO_4 tartılıp, son hacim 200 ml olacak şekilde distile suda eritildi.
- DTNB çözeltisi: 1,3837 g sodyum sitrat tartılıp, son hacim 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanan %1'lik sodyum sitrat çözeltisi ile 40 mg DTNB eritildi.

SDS-PAGE ve Western-Blott yöntemi için kullanılan çözeltiler:

- Örnek tamponu (sample buffer) x2 stok: 1,25 ml tris-HCl (0,5 M ph:6,8), 2,5 ml gliserol, 2 ml %10'luk SDS, 0,2 ml %0,5'lik Bromofenol-blue son hacim 9,5 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı. 1 ml örnek tamponu kullanımı için 50µl b-merkaptoetanol ve 950 µl hazırlanan çözeltiden karıştırıldı.
- Yürütme tamponu (running buffer) x10 stok (Ph:8,3) : 30,3 g tris base, 144 g glycine, 10 g SDS tartılıp, son hacim 1 lt olacak şekilde distile suda eritildi.
- Transfer tamponu (transfer buffer) x10 stok: 30,3 g tris base, 144 g glycine, tartılıp, son hacim 1 lt olacak şekilde distile suda eritildi. İhtiyaç duyulan tampon miktarı %20 metanol içerecek şekilde x10'luk stok kullanılarak hazırlandı.
- Yıkama tamponu (TBS-T) x10 stok: 12,11 g tris base, 87,66 g NaCl ve 5ml tween 20 son hacim 1lt ve ph:7,5 (ph ayarı için HCl kullanıldı) olacak şekilde distile suda eritildi.
- Membran bloklama tamponu (%5'lik süt tozu): 5 gr yağsız süt tozu tartılıp, son hacim 100 ml olacak şekilde yıkama tamponu ile tamamlandı.
- Antikor tamponu: kullanılacak antikora uygun dilüsyonlarda yine yıkama tamponu kullanılarak hazırlandı.

- Ayırma jeli (%10'luk resolving gel): 2,5ml %40 acrilamid/bis, 2,5 ml 1,5M Tris-HCl (pH8,8), 100µl % 10'luk SDS, 4,8 ml distile su, 100µl Amonyum persülfat (APS) ve 10µl TEMED ile son hacim 10 ml elde edildi (2 jel dökümü için yeterli miktar). Her bir jel için karışımdan 5ml kadar için cam plaklar arasına döküldü, üzerleri distile su ile kaplandı ve 30 dk polimerleşmesi için bekletildi.
- Yığınlama jeli (% 4' lük stacking gel): 0,5ml %40 acrilamid, 1,25 ml 0,5M Tris-HCl (pH6,8), 50 µl % 10 luk SDS, 3,2 ml distile su, 50 µl Amonyum persülfat (APS) ve 5 µl TEMED) ile son hacim 5 ml elde edildi (2 jel dökümü için yeterli miktar). Ayırma jeli polimerleştikten sonra üzerindeki distile su uzaklaştırılıp üzerine yığınlama jeli döküldü ve yükleme kuyucuklarının elde edilmesi için tarak yerleştirildi. Bu jelin polimerizasyonu için de 30 dk beklendi

3.2. Yöntem

3.2.1. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu

Hipokampuslar tartılıp, SDS-PAGE ve Western Blot prosedürü uygulanmak üzere ayrıldı. Örneklerin homojenizasyonu için sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

- 1) Hipokampus dokusundan 20 mg doku tartıldı.
- 2) Her bir doku örneği üzerine 1,2 ml PRO-PREP Protein Extraction Solution eklendi.
- 3) Sonikatör vasıtasıyla buzlu ortamda homojenizasyon yapıldı.
- 4) -20°C ' de 30 dk inkübe edildi.
- 5) $+4^{\circ}\text{C}$, 13000 rpm' de, 5 dk santrifüj yapıldı.
- 6) Süpernatantlar alikotlandı ve -80°C ' de muhafaza edildi.

3.2.2. Bradford Protein Tayin Metodu

Metodun asıl sahibinin adıyla bilinen bu yöntem¹⁹⁰ bir çözeltideki protein içeriğinin saptanması için boya temelli, hızlı ve güvenilir bir ölçümdür. Bradford reaktifi içersindeki Coomassie Brilliant mavisinin maksimum absorbansı proteine bağlandığı zaman 465 nm'den 595 nm' ye kayar ve absorbans değeri proteinin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bu yöntem 0-2 mg/ml aralığındaki protein konsantrasyonunun ölçümü için uygundur. Bovine Serum Albumin (BSA) gibi standart bir proteinin kullanılmasıyla elde edilen konsantrasyon-absorbans grafiği çözeltideki protein miktarının hesaplanmasını sağlar.

Bradford protein tayin metodunda sık kullanıldığı üzere standart protein olarak BSA seçildi. Standartların elde edilmesi için öncelikle PBS ile 20 mg/ml stok BSA hazırlandı ve bu stoktan yine PBS ile uygun dilüsyonları yapılarak;

Standart 1: 2 mg/ml

Standart 2: 1,5 mg/ml

Standart 3: 1 mg/ml

Standart 4: 0,5 mg/ml

Standart 5: 0,25 mg/ml

Standart 6: 0 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde 6 standart oluşturuldu. Elde edilen 1-6 standart BSA ve hipokampus dokusundan hazırladığımız örnekler ikişer tekrarlı olacak şekilde 10 µl hacimde kuyulara yüklenip üzerlerine 250 µl Bradford çözeltisi eklendi. Ardından örnekler Elisa okuyucusunda 595 nm’de okutuldu. Standartlar ve örnekler için okunan ikili absorbans değerlerinin aritmetik ortalaması alındıktan sonra 1-6 standart BSA değerleriyle Microsoft Office Excel’de konsantrasyon-absorbans grafiği oluşturuldu. Elde edilen lineer eğrinin denkleminde örneklerimizdeki protein miktarı mg/ml cinsinden hesaplandı.

Western blott tekniği uygulamasında her bir örnekten 20 µg’lık protein yüklemesi yapacağımız için her bir örnekten alınması gereken hipokampus doku homojenat volümlerini aşağıdaki formülle hesapladık:

$$20 \mu\text{g protein yüklemek için gerekli volüm} = 20 / \text{protein konsantrasyonu}$$

3.2.3. SDS-PAGE (Laemmli) Yöntemi

Western blott tekniğinde araştırılacak hedef proteinin özelliklerine göre kullanılacak tampon sistemi, jel içeriği ve elektroforez işlemi değişkenlik gösterebilir. SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis) sisteminde b-merkaptoetanol, sds, bromofenol mavisi, sukroz veya gliserol içeren örnek tamponları (sample

buffer) kullanılır. Örnek tamponlarının içeriği büyük önem arz eder; örneğin, merkaptoetanol, proteinlerin tersiyer yapısını oluşturan disülfid bağlarını indirgerken, polianyonik bir deterjan olan SDS'de çözelti içindeki proteinlerin çevresini sararak çözeltideki tüm proteinlerin negatif şarjlanmasını sağlar. Bu sayede elektroforezde proteinlerin ayrılma şartını belirleyen şarj özellikleri değil moleküler ağırlıkları olacaktır ve küçük olan molekül daha hızlı göç edecektir.

SDS-PAGE işleminde kullanılacak olan poliakrilamid jeller üstte yığılma jeli (stacking gel), onun altında ise ayırma jeli (resolving gel) denilen iki kısımdan oluşur. Yığılma jelinin konsantrasyonu (%4 vb.) ayırma jeline (%6-14) göre daha düşük konsantrasyonda hazırlanır. Dolayısıyla yığılma jeli örneklerin yüklendiği büyük porlu; ayırma jeli ise örneklerin yürütüldüğü daha küçük porlu poliakrilamid jellerdir.

Özellikle ayırıcı jel kısmının konsantrasyonunun belirlenmesinde araştırılacak olan hedef proteinin moleküler ağırlığı önem arz eder. Düşük konsantrasyonlu yani büyük porlar ihtiva eden jeller büyük molekül ağırlıklı proteinleri; yüksek konsantrasyonlu yani küçük porlar ihtiva eden jeller ise küçük molekül ağırlıklı proteinleri ayırmak için idealdir.

Araştırmamızdaki hedef proteinimiz olan bcl-2 ve yükleme kontrolü olarak tercih ettiğimiz b-actin için yığılma jelini % 4; ayırma jelini ise %10'luk konsantrasyonda hazırladık.

Hazırlanan jellere kuyucuk başına son konsantrasyon 20 µg protein içerecek şekilde, doku homojenatı yükleme tamponuyla 1/1

oranında karıştırılarak uygulandı. Elde edilen son yükleme volümü kuyulara yüklenmeden önce vortekslenip ardından protein denatürasyonu için 95°C’ de 5 dk kaynatıldı. Örnekler soğutulduktan hemen sonra dikkatlice jeldeki kuyucuklara yüklendi. Jeldeki ilk kuyucuk referans amaçlı renkli markerımız (Invitrogen SeeBlue Plus2 Pre-Stained, 5 µl) için kullanıldı.

3.2.4. Western Blott Yöntemi

1979 yılında bulunan bu teknik ‘western blott’, ‘protein immunoblott’ yada sadece ‘immunoblott’ isimleriyle bilinmektedir. Bu teknik antikor tespitinin özgüllüğü ile jel elektroforezinin rezolüsyonunu bir araya getiren bir yöntemdir. Geleneksel olarak kompleks bir örnek (doku yada hücre lizatı vb.) içersinde düşük miktardaki proteinlerin bulunması yada protein sentezi ve temizlenmesinin izlenmesi için kullanılır. Blotlama tekniği bir antijenin varlığı ve miktarı, moleküler ağırlığı ve antijen izolasyonunun etkinliği gibi protein antijenlerinin önemli özelliklerini belirlemede kullanılabilir. Bu teknik ile özel bir proteinin moleküler ağırlığı bilgisinin yanısıra işlenmiş ürünlerden izoformların ayrımı da mümkündür.^{191,192}

Çalışmamızda yöntemle bağlı işlem basamaklarımız şöyledir:

- Yürütme (running): Jel kasetleri elektroforez tankına yerleştirilip, tank yeteri kadar yürütme tamponu ile dolduruldu. Örnekler yığınlama jeli boyunca 100 V; ayırma jeli boyuncada 160 V’ ta yaklaşık 1 saat boyunca yürütüldü.
- Transfer: Kasetten çıkarılan jeller cam plaklarından ayrılıp transfer sandviçi hazırlandı. Jelde yürütülmüş olan proteinlerin nitrosellüloz

membrana transferi, transfer tamponu içersinde 350 mA'de ve 30 dk süre zarfında tamamlanmıştır.

- Bloklama: Transfer işlemi yapılan membranlar yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra membran bloklama tamponu içersinde 2 saat süre ile, oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde bekletildi. Böylece hedef proteinin membran üzerinde zgn olmayan bağlanma noktaları engellenmiş oldu.
- İmmunoblott: Bloklama işleminin ardından membranlar 5'er dk süre ile 3 kez yıkandı. Membranlar, kullanılacak primer antikora uygun dilüsyonda hazırlanan 15 ml'lik antikor tamponu içersinde oda sıcaklığında, 1,5 saat boyunca, karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. 5'er dk' lık süre ile 3 kez yıkama işleminin ardından benzer şekilde sekonder antikor inkübasyonu oda sıcaklığında 1,5 saat süre zarfında gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası aynı yıkama işlemi tekrar edildi.
- Görüntüleme: Membran zerindeki bantlar kemilüminesans çalışma kiti kullanılarak medikal X-Ray filme aktarıldı. Membran film kasetinde 4dk bekletildi ve ardından filmin karanlık oda yıkamaları yapıldı. Filmlerin görüntü taraması 1200dpi de yapıldı.
- Analiz: Bant yoğunluklarının hesaplanmasında Image J programı kullanıldı.

3.2.5. Dokuda TBARS Tayin Yöntemi

Hipokampus dokusunda lipid peroksidasyon derecesini belirlemek için tiobarbitürik asit reaktif madde oluşumu yöntemi kullanıldı.⁶⁵

Bu yöntemde öncelikle doku örneklerini hazırlamak için sırasıyla şu işlemler yapıldı:

- 1) 0,04 gr doku, (x18 kat) 0,72 ml %10'luk Trikloaraasetik Asit (TCA) içersinde buzlu ortamda sonicator cihazı vasıtasıyla homojenize edildi.
- 2) +4 °C 'de 4000rpm'de 15 dk süre ile santrifüj edildi.
- 3) Örneklerin süpernatantları alındı.
- 4) +4 °C 'de 4000rpm'de 8 dk süre ile ikinci kez santrifüj edildi.

Bu şekilde hazırlanan örneklerde lipit peroksidasyon düzeyini saptamak için ardından sırasıyla aşağıdaki işlemler yapılmıştır:

- 1) Cam tüpe alınan 250 µl örnek üzerine 3,3 µl %1'lik Butillenmiş Hidroksitoluen (BHT) ve 250 µl Tiobarbitürik Asit (TBA) eklendi.
- 2) Cam tüpteki örnekler 100°C'deki kaynar su banyosunda 15 dk bekletildi.
- 3) Örnekler soğutulduktan sonra 4000 rpm' de 8 dk santrifüj edildi.
- 4) Her bir örneğin absoransı 532 nm' de tayin edildi.
- 5) Elde edilen absoranslardan $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak hipokampus dokusu için lipid peroksidasyon düzeyi MDA eşdeğeri olarak ifade edildi.

3.2.6. Dokuda Glutatyon Tayin Yöntemi

Hipokampus dokusunda glutatyon (GSH) tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı.¹⁸⁹ Doku örneklerinin hazırlanışı TBARS tayin yöntemindeki gibidir. Ardından yapılan işlemler sırasıyla şöyledir:

- 1) 100 µl örnek, 400 µl 0,3 M Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4) ve 50 µl ditiyobisnitrobenzoat (DTNB, Elman Reaktifi) birlikte vortekslendi.
- 2) Oda sıcaklığında 5-10 dk beklendi.
- 3) 412 nm' de absorbansları ölçüldü.
- 4) Elde edilen absorbanslardan $13\ 600\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak hipokampus dokusu için GSH düzeyleri belirlendi.

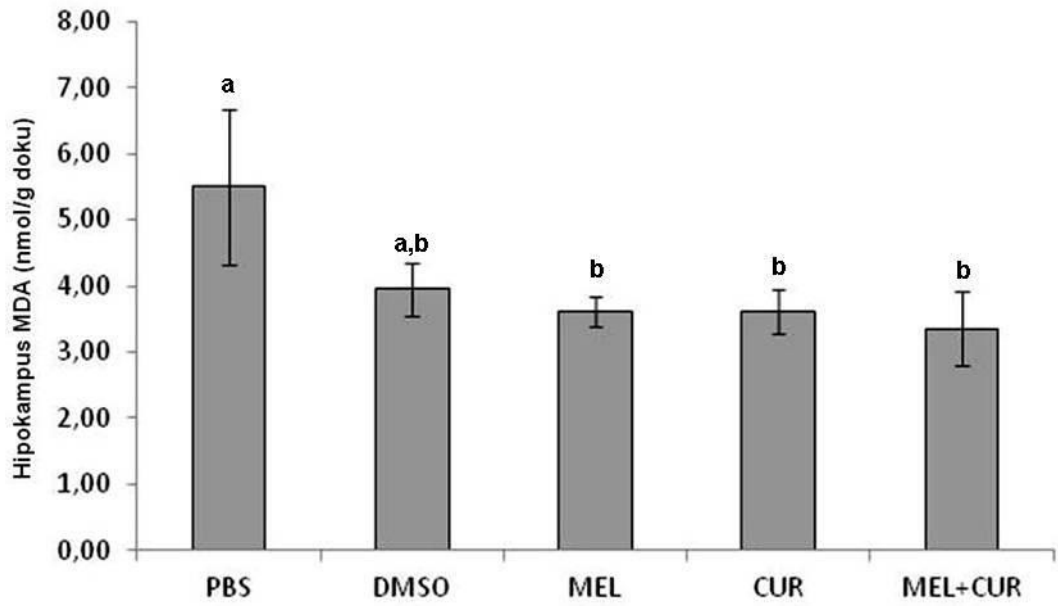
3.2.7. İstatiksel Analiz

Çalışmamızdaki verilerin değerlendirilmesinde "SPSS 11.4 for Windows" Programında ANOVA analizi yapılmış, gruplar arasındaki farklar LSD testi ile incelenmiştir. Son olarak ta değişkenler arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon katsayısı hesaplanarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hipokampus Doku MDA Düzeyleri

Melatonin (MEL), Curcumin (CUR) ve Melatonin+Curcumin (MEL+CUR) çalışma gruplarında hipokampus doku MDA düzeylerinin PBS kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı bulundu (sırasıyla; $3,62 \pm 0,22$ nmol/g doku, $3,62 \pm 0,34$ nmol/g doku, $3,36 \pm 0,56$ nmol/g doku, $5,50 \pm 1,17$ nmol/g doku, $p < 0,05$). (Grafik 1) (Tablo11)



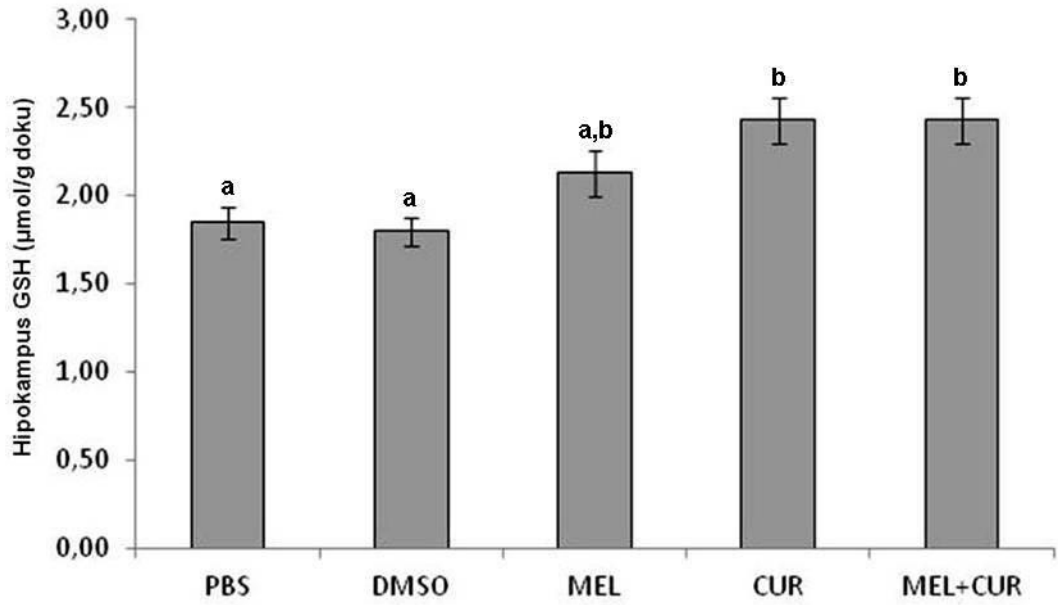
Grafik 1: Hipokampus MDA düzeylerinin gruplara göre değişimi

(Aynı harfleri içermeyen gruplar arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşma vardır)

MEL, CUR, MEL+CUR gruplarında PBS kontrol grubuna göre MDA düzeyi anlamlı olarak azalmıştır.

4.2. Hipokampus Doku Glutasyon Düzeyleri

CUR ve MEL+CUR gruplarındaki hipokampus doku GSH düzeyleri PBS ve DMSO kontrol grupları ile karşılaştırıldığında GSH düzeylerinin anlamlı olarak arttığı bulundu. (sırasıyla; $2,43 \pm 0,13 \mu\text{mol/g}$, $2,43 \pm 0,13 \mu\text{mol/g}$, $1,85 \pm 0,09 \mu\text{mol/g}$, $1,80 \pm 0,08 \mu\text{mol/g}$, $p < 0,05$). Ancak; MEL grubu diğer gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmadı ve benzer şekilde çalışma grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (Grafik 2) (Tablo11)



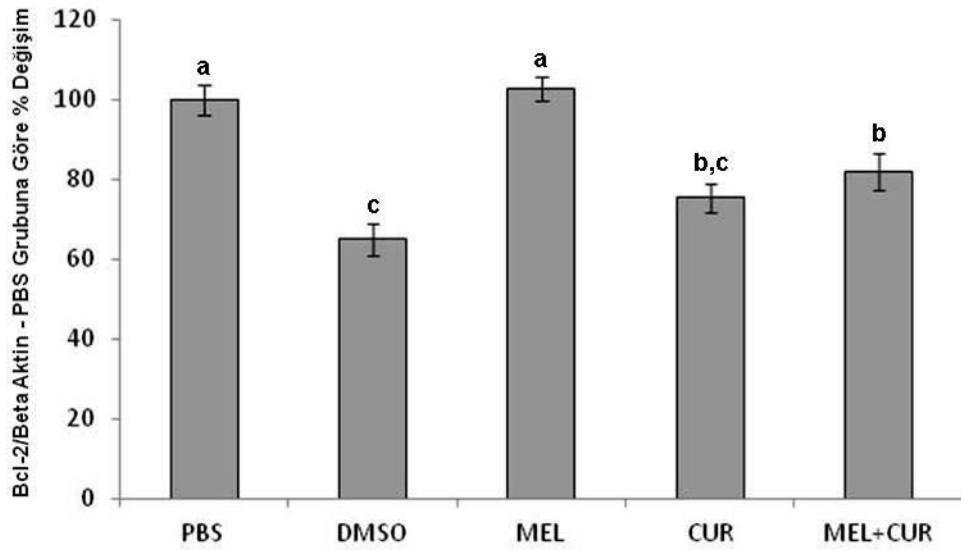
Grafik 2: Hipokampus GSH düzeylerinin gruplara göre değişimi

(Aynı harfleri içermeyen gruplar arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşma vardır)

CUR ve MEL+CUR gruplarında PBS ve DMSO kontrol grubuna göre GSH düzeyi anlamlı olarak artmıştır.

4.3. Hipokampus Doku Bcl-2 Düzeyleri

CUR, MEL+CUR ve DMSO uygulaması yapılan gruplar, PBS kontrol grubu ve MEL uygulaması yapılan çalışma grubuyla karşılaştırıldığında hipokampal bcl2/beta aktin oranının anlamlı olarak azaldığı bulundu. (sırasıyla; $75,55 \pm 3,59$ bcl2/beta aktin, $81,84 \pm 4,62$ bcl2/beta aktin, $64,99 \pm 3,90$ bcl2/beta aktin, $100,03 \pm 3,75$ bcl2/beta aktin, $102,64 \pm 3,01$ bcl2/beta aktin $p < 0,05$). Ayrıca; DMSO uygulamasının MEL+CUR uygulaması yapılan çalışma grubuna kıyasla bcl2/beta aktin oranını anlamlı olarak azalttığı bulundu ($p < 0,05$). (Grafik 3) (Tablo11)



Grafik 3: Hipokampus Bcl-2/beta aktin düzeylerinin gruplara göre değişimi
(Aynı harfleri içermeyen gruplar arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı farklılaşma vardır)

DMSO, CUR, MEL+CUR gruplarında PBS kontrol ve MEL çalışma grubuna göre bcl2/beta aktin oranı anlamlı olarak azalmıştır. DMSO grubunda MEL+CUR grubuna göre bcl2/beta aktin oranı anlamlı olarak azalmıştır.

4.4. MDA, GSH, Bcl-2 Düzeyleri Arasındaki İlişki

CUR ($r(6) = -0,74$; $p=0,05$) ve MEL+CUR ($r(6) = -0,78$; $p<0,05$) uygulaması yapılan her iki grupta da MDA ve GSH düzeyleri arasında negatif korelasyon bulundu ancak; bcl-2 düzeyiyle ilişkili korelasyon bulunmadı. MEL çalışma grubunda ise MDA, GSH ve bcl-2 düzeyleri arasında korelasyon bulunmadı.

Tablo 11: Grupların istatistiksel değişimleri (ortalama±SH)

Parametreler	KONTROL		DENEY		
	PBS	DMSO	Melatonin	Curcumin	Melatonin+Curcumin
Ağırlık (g)	358,16±17,78	336,50±11,85	345,50±12,82	340,57±18,63	348,75±8,29
MDA(nmol/g)	5,50±1,17 ^a	3,96±0,40 ^{a,b}	3,62±0,22 ^b	3,62±0,34 ^b	3,36±0,56 ^b
GSH (µmol/g)	1,85±0,09 ^a	1,80±0,08 ^a	2,13±0,13 ^{a,b}	2,43±0,13 ^b	2,43±0,13 ^b
Bcl-2/beta aktin	100,03±3,75 ^a	64,99±3,90 ^c	102,64±3,01 ^a	75,55±3,59 ^{b,c}	81,84±4,62 ^b

(Her bir satırda aynı harfleri içermeyen gruplar arasında p<0,05 düzeyinde anlamlı farklılaşma vardır)

MEL, CUR, MEL+CUR gruplarında PBS kontrol grubuna göre MDA düzeyi anlamlı olarak azalmıştır.

CUR ve MEL+CUR gruplarında PBS ve DMSO kontrol gruplarına göre GSH düzeyi anlamlı olarak artmıştır.

DMSO, CUR, MEL+CUR gruplarında PBS kontrol ve MEL çalışma grubuna göre bcl2/beta aktin oranı anlamlı olarak azalmıştır.

DMSO grubunda MEL+CUR grubuna göre bcl2/beta aktin oranı anlamlı olarak azalmıştır.

5. TARTIŞMA

Birçok fizyolojik süreçte sınırlı miktarda üretilen endojen kaynaklı reaktif oksijen türleri homeostazisin sürdürülmesinde gereklidir. Endojen yada ekzojen kaynaklı ROS üretimindeki artış antioksidan sistemler tarafından dengelenmeye çalışılır. ROS üretimindeki aşırı artış ya da antioksidan sistemlerdeki azalma/yoksunluk halinde ise hücrel redoks denge bozulur. Dolayısıyla, ROS'ların antioksidanlarla dengelenmediği durumlarda hücreler oksidatif strese maruz kalır ve hücrel komponentlerde ROS'ların yıkıcı etkileri görülmeye başlar.^{79,82}

Yaşam süresince özellikle serbest radikallerin ve reaktif türlerin makromoleküller(DNA, RNA, protein, lipit, karbonhidrat, moleküler konjugatlar vb) üzerindeki yıkıcı etkisi antioksidan savunma sistemleri ile giderilmeye çalışılır. Hücreler, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimleriyle ve dışarıdan aldığı C vitamini, E vitamini ve karetenoid gibi diğer antioksidanlarla oksidatif stresin yarattığı yıkıcı etkileri önlemeye çalışırlar.⁶⁸ Ancak; antioksidan savunma ve DNA tamir sistemlerinin azalmasıyla beraber makromoleküler düzeyde maruz kalınan hasarlar, bu hasarların birikimi ve ilişkili genetik programlamalar organizmayı yaşlanma ve sonuçta ölüm sürecine sokar.

Yaşlanmayla ilişkili olarak Alzheimer ve Parkinson gibi bir çok nörodejeneratif hastalık, kanser ve bazı kardiyovasküler, metabolik hastalıkta da ROS'lara bağlı oksidatif hasar artışı gösterilmiştir⁸². Nörodejeneratif hastalıklarda hipokampus, frontal korteks ve limbik vb bölgelerde kademeli nöron kaybı,⁷⁴ GSH, GSH reduktaz, GSH-S tranferaz, SOD, katalaz, tiyoredoksin reduktaz gibi antioksidan enzimlerin

azaldığı, lipid peroksidasyon ürünleri, protein oksidasyonu ve nitrasyonunun ise arttığı gösterilmiştir.^{75,76}

Yaşlanma ile birlikte sinir sistemindeki gerileme fizyolojik yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olup en iyi gösterge hafıza ve kognitif fonksiyonlardaki kayıplardır. Yaşlanmayla beraber, nörogezezin en aktif olduğu yerlerden biri olan hipokampusta var olan nöron sayısı ve NSC (neural stem/progenitor cells) hücrelerinin proliferasyonu ve sağkalım oranları da azalmaktadır.^{6,7} Bu durum yaşlanmayla beraber hipokampusta ROS üretiminin artışı, antioksidan savunma sistemlerinin (GSH enzim sistemi, SOD, katalaz vb) azalması, lipid peroksidasyon ürünü MDA düzeylerinin artışı ile ilişkilendirilmiştir.^{8,9}

Melatonin, birçok biyolojik etkisinin yanı sıra antioksidan özelliği ile serbest radikalleri ortadan kaldırarak oksidatif stresi önleyen bir hormondur. Yaşlanma ile birlikte melatonin düzeyleri azalırken, oksidatif stres artmaktadır, dolayısıyla yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogenezinde de melatoninin önemli rolü olabileceği düşünülmektedir.^{141,143} Sıçanlarda, uzun süreli ekzojen melatonin kullanımının yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir.¹⁴⁴ Ayrıca yaşa bağlı hastalıkların gelişiminde de melatoninin geciktirici rolü olduğu belirtilmektedir.^{143,145} Melatonin, özellikle hidroksil ve peroksid radikallerini süpürmede yüksek bir kapasiteye sahiptir.¹³⁸ Mannitol, glutatyon, vit E ve vit C gibi bilinen çoğu antioksidandan daha etkin olduğu kabul edilmektedir.¹³⁷

Yaşlanma, ilişkili nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli nörodejeneratif modellemelerde hipokampus ta dahil beynin birçok bölgesinde antioksidan kapasitede azalma (GSH sistemi, SOD, katalaz vb) buna karşın MDA gibi lipid peroksidasyon ürünlerinde ise artış gösterilmiştir.^{8,9,76,164} Melatonin ise antioksidan özellikleri ile hipokampus ve beynin diğer bölgelerinde nöroprotektif fonksiyon göstermektedir.^{19,165,166} ROS'lar hipokampusta LTP (long term potentiation) mekanizmasını bloklarak nöronal plastisitenin devamlılığına engel olurken¹²⁰, melatonin hem eksitatorik ve inhibitörük nörotransmitter sistemlerini etkileyerek hem de hipokampal nöronlarda LTP (long term potentiation) mekanizması ile ilişkili NMDA reseptör aktivitelerini değiştirirerek plastisite üzerine de olumlu etkiler yaratır.^{171,172,173} Ayrıca, spinal kord yaralanmaları¹⁵³ Parkinson^{154,155}, Alzheimer¹⁹³, iskemi-reperfüzyon modelleri^{156,157} ve oksidatif stres oluşturulan¹⁵⁸ çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalarda melatoninin farklı nöral yapılarda nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir.

Görüldüğü üzere literatürde melatonin uygulamasının yaşlı sıçanlarda oksidatif stresi azalttığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Bizim çalışmamızda da melatonin uygulaması yaşlı sıçan hipokampusunda MDA düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır.

Lipofilik özellikli bir polifenol olan Curcuminin oldukça güçlü antinflamatuar, antiproliferatif, antioksidan ve antitümör etkilerinin olduğu bilinmektedir.^{15,16,17} Curcuminin yapısında azid, halopiroksil, Br₂ radikalleri ile birlikte birçok reaktif oksidanla reaksiyona giren fenolik OH grubu yer alır. Birçok in vivo ve in vitro çalışmada^{20,179,180,181} farklı organlardaki yaşlanma, kanser ve çeşitli oksidatif stres koşulları altında Curcuminin, lipid peroksidasyonu inhibe ettiği ve antioksidan (SOD, GSH, GST ve GPx)

aktiviteyi artırdığı gösterilmiştir. Curcuminin, antioksidan ve nöroprotektif etkileri yaşlı sıçanların korteks, hipokampus, serebellum gibi farklı beyin bölgelerinde de gösterilmiştir.²⁰ Curcumin yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli toksik koşullar altında da hipokampusta SOD, GSH, GST ve GPx gibi antioksidan enzim düzeylerini arttırırken; lipid peroksidasyon ürünlerini (MDA) azaltmaktadır.^{20,182,183} Curcuminin nöroprotektif etkileri ile hipokampal nörojenezi uyardığı¹⁸⁴, dolayısıyla da öğrenme ve bellek işlevlerini geliştirdiği gösterilmiştir.²¹

Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak yaşlı sıçanlarda curcumin uygulaması ile lipid peroksidasyon ürünü MDA düzeyi anlamlı olarak azalırken, antioksidan GSH düzeyleri anlamlı olarak artmıştır. Benzer bulgular melatonin ve curcuminin birlikte verildiği çalışma grubumuzda da görülmekle beraber; curcumin, melatonin+curcumin çalışma gruplarında MDA ve GSH arasında da negatif koreleasyon bulundu. Ancak; melatonin ve curcuminin birlikte verilmesi ayrı ayrı verildikleri gruplara kıyasla anlamlı değişiklik yaratmamıştır.

Antioksidan ve aynı zamanda antiapoptotik özellikleri birçok çalışmada tanımlanmış olan Bcl-2, dağılımı hücre tipine göre değişkenlik gösteren bir hücre içi membran proteinidir. Bcl-2, reaktif oksijen türlerinin en fazla yapıldığı yer olan mitokondrial dış membran ve onun yanısıra ER ve nükleus zarında da yer alır. Hücrel redoks dengenin sağlanmasında önemli rol oynayan Bcl-2'nin bu özelliğini direk bir anti-oksidan gibi davranarak, redoks-aktif metalleri şelatlayarak ya da ROS üretiminin azaltılmasını sağlayarak gösterdiği düşünülmektedir.¹¹³ Bcl-2'nin antioksidan özelliklerine ilişkin lipid peroksidasyonu azalttığı, glutatyon tükenmesi ve H₂O₂' yıkıcı etkilerinin neden olduğu apoptotik ölüme karşı da direnç sağladığı bilinmektedir.¹¹²

Fizyolojik yaşlanma ve nörodejeneratif olgularda, Hipokampus da dahil beynin farklı bölgelerinde ve farklı organ dokularında bcl-2 ekspresyonu, bcl-2'nin hücre (mitotik/postmitotik hücre) spesifik aktivitesi ve hücrenin sağkalım koşullarının farklılığı ile değişkenlik göstermektedir.^{115,116,117} Bcl-2 geninin fazla eksprese edilmesi nöral dokularda olduğu gibi apoptozu önleyerek koruyucu etkilerini g sterirken¹¹⁴; lenfoma, lösemi, prostat, kolon ve mide adenokanserleri, nöroblastoma, renal hücreli kanserler ve melenoma gibi çeşitli insan kanserlerinde de bcl-2 ekspresyonunda aşırı artış görülür.

Wu Yan ve arkadaşları farelerde 2. haftadan itibaren bcl-2 düzeylerinin azalmaya başladığını, 3-16 aylar arasında ise giderek arttığını göstermişlerdir.¹⁹⁴ Kaufmann ve arkadaşları da 24 aylık yaşlı sıçanların hipokampus ve serebellumunda bcl-2 düzeyinin up-regüle olduğunu ve bu up-regülasyonun yaşlanmayla artan oksidatif stresi kompanse etmeye çalışan bcl-2' nin antioksidan karakteri ile ilişkili olabileceğini göstermişlerdir.¹¹⁷ Ayrıca PBN (N-tert-butyl- -phenylnitrone) gibi bir serbest radikal süpürücüsü ile yapılan antioksidan tedavide bcl-2 up-regülasyonun tersi yönde bozulduğunu da belirtmişlerdir.¹¹⁷ Pollack ve arkadaşları ise 6 ve 24 aylık sıçanlarda kalp, iskelet kası ve beyin dokusunda bcl-2, bax, sit-c ve kaspaz 3 düzeylerini incelemişler ve bu dokularda farklı sonuçlar bildirmişlerdir.¹¹⁵ Beyin dokusunda bcl-2 düzeyinin yaşlı sıçanlarda değişmediğini, bax düzeyinin azaldığını dolayısıyla bcl2/bax oranının arttığını ve beraberinde sitozolik sit-c ve kaspaz3 aktivitesinde de değişiklik olmadığını bildirmişlerdir.¹¹⁵ Başka bir çalışmada ise hipokampusta oksidatif stres kaynaklı hücre ölümünde bcl-2 ve bcl-2 mRNA ekspresyonlarının down-regüle olduğu, NAC (N-acetyl cysteine) gibi antioksidan suplemantasyonunun ise bu azalışı engellediği gösterilmiştir.¹⁰

Savory ve arkadaşları¹¹ tavşanların serebral korteks ve hipokampus CA1 bölgesinde alüminyum kaynaklı nörodejenerasyon geliştirmişler ve bu bölgelerde oksidatif stres, bcl2/bax oranı ve apoptoz düzeylerini araştırmışlardır. Yaşlı tavşanların hipokampal nöronlarında ilk 3 saat içerisinde oksidatif stres düzeyi ve redoks-aktif demir birikimi hızlı bir şekilde artmış ve bu yanıtlar 72 saatte maksimum düzeye ulaşmıştır. Artan oksidatif stres düzeyine paralel 3 saat sonrasında bcl-2 düzeyi up-regüle olurken, bax düzeylerinde azalma kaydedilmiş ve dolayısıyla bu süreç apoptozla sonuçlanmamıştır ancak; 72 saat gibi uzun bir süre oksidatif strese maruz kalındığında bcl-2 düzeyi down-regüle olurken bax düzeyleri artmış ve apoptoz görülmeye başlanmıştır. Genç grupta ise 72 saat sonrasında bile bcl-2 düzeyleri yüksek, bax düzeyi ise düşük seviyelerde kalmış ve apoptoz gözlenmemiştir.

Savory¹¹, Kaufman¹¹⁷, Wu Yan¹⁹⁴ ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalar göz önüne alındığında yaşlanma sürecinde artan oksidatif stresi kompanse etmede antioksidan özelliğinden ötürü bcl-2'nin up-regüle olması ve oksidatif stresi azaltacak bir antioksidan tedavide ise bcl-2 up-regülasyonunun azalması muhtemel gözükmemektedir. Nitekim bizim çalışmamızda da melatonin, curcumin ve melatonin+curcumin verilen gruplarımızda antioksidan tedavi yapmış olmamız bu gruplarda MDA düzeylerini azaltmış ve curcumin, melatonin+curcumin verilen gruplarda da GSH düzeylerini arttırmıştır. Dolayısıyla bu gruplarda bcl-2 düzeyinde azalma görmemiz literatürle de uyumlu gözükmemektedir ve bu etki curcumin, melatonin+curcumin ve DMSO verilen gruplarımızda görülmüştür. Yalnızca melatonin verilmiş olan çalışma grubumuzda ise bcl-2 düzeyi değişmemiştir. Çalışmamızı yaşlı sıçanlar üzerinde yapmayı planlamış olmamıza rağmen 13 aylık orta yaşlı sıçanlarda çalışmak durumunda kalmamız muhtemelen melatoninin bcl-2 üzerindeki etkisini görmemizi engellemiştir. Melatonin hormonu yaşlanmayla azalmaktadır

ancak orta yaşlardaki bu azalış henüz kritik düzeylerde olmadığı için¹⁹⁵ bu etkileri daha yaşlı gruplarda görmek olasıdır. Ayrıca alışma gruplarımızdan curcumin için çözücü olarak kullandığımız DMSO'nun bcl-2' yi azaltıcı etkisi melatonin+curcumin grubuna kıyasla da anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Nitekim literatürde de DMSO uygulamasının hipokampus ta dahil farklı beyin bölgelerinde nöroprotektif etkisi gösterilmiştir.^{196,197}

6. SONUÇ

Yaşlanma ile birlikte sinir sistemindeki gerileme fizyolojik yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olup en iyi gösterge hafıza ve kognitif fonksiyonlardaki kayıplardır. Yaşlanma ve yaşlanmayla ilişkili nörodejeneratif hastalıklarda korteks, hipokampus gibi beynin birçok bölgesinde radikal hasar artışı gözlenmektedir.

Çalışmamızdan elde edilen bulgular, yaşlanmayı açıklamaya çalışan temel teorilerden biri olan serbest radikal teorisini desteklemektedir. Çalışmamızda melatonin uygulaması radikal hasar düzeyini anlamlı düzeyde azaltırken, curcumin, curcumin ve melatoninin birlikte uygulanması radikal hasar düzeyini azaltmakla beraber GSH düzeyini de arttırmıştır. Ayrıca; curcumin, curcumin ve melatoninin birlikte uygulanması bcl-2 düzeylerini de azaltmıştır.

Yaşlanmada radikal hasar düzeylerindeki artışla beraber, fizyolojik olarak melatonin düzeylerinin ve GSH sistemi gibi diğer antioksidan sistemlerin etkinliklerinin de azalıyor olması göz önüne alındığında, çalışmamızda orta yaşlı sıçanlarda melatonin ve curcumin uygulamasının, yaşlanma sürecinden en çok etkilenen hipokampus gibi nöral yapıları nörodejeneratif hasarlara karşı korumada etkili olabileceği gösterilmiştir.

Elde edilen verilerimiz ve literatür incelendiğinde bcl-2 düzeylerinin özellikle fizyolojik yaşlanma sürecinde nasıl değiştiğini açıklayan daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir. Bu araştırmamızda genç kontrol grupları ve en az 20 ay ve üzeri yaşlı

sıçanlardan oluşan çalışma gruplarının da araştırmaya dahil edilmesinin, yaşlanmada hem oksidatif stres hem de bcl-2 up-regülasyon değişimlerinin daha net gösterilmesine ve açıklanmasına olanak sağlayacağını gördük. Ayrıca; ek olarak, bu araştırmada proapoptotik bax protein düzeylerinin ya da aktivatör kaspaz aktivitesinin araştırılması yaşlanmada oksidatif stres ve apoptoz ilişkisinin de gösterilmesine katkı sağlayacaktır.

7. ÖZET

YAŞLI SIÇANLARDA HİPOKAMPUSTA OKSİDATİF STRES VE BCL-2 İLİŞKİSİ

THE RELATIONSHIP BETWEEN OXIDATIVE STRESS AND BCL-2 IN HIPPOCAMPUS OF OLDER RATS

Yaşlanmada çeşitli dokularda radikal yapımı artarken, antioksidan kapasitede azalma görülür. Bu durum hipokampusta dahil beynin farklı bölgelerinde gözlenen nörodejeneratif hastalıklarla birliktedir. Güçlü bir radikal süpürücü olarak bilinen melatonin yaşlanmada azalır. Curcumin ise oldukça güçlü antinflamatuar, antiproliferatif ve antioksidan özellikleri olan bir polifenoldür. Hücrel redoks dengenin sağlanmasında rol oynayan bcl-2'nin de antioksidan ve antiapoptotik özellikleri tanımlanmıştır.

Çalışmamızda orta yaşlı sıçanlarda melatonin ve curcumin uygulamasının hipokampus dokusunda oksidatif stresin göstergesi MDA, antioksidan sistem göstergesi olarak fonksiyon gören GSH ve hücrel redoks düzenleyici bcl-2 düzeylerini nasıl etkilediğini araştırdık. Bu amaçla, MDA tayini için TBARS, GSH için modifiye Ellman, bcl-2 düzeyinin belirlenmesi için de western blot yöntemi kullanıldı. Etik kurul onayını takiben Wistar sıçanlardan laboratuvar şartları altında 12 saat aydınlık- karanlık siklusunda kalacak şekilde 5 grup oluşturuldu (13 aylık, n=30). Kontrol grubu (%1 etanol-PBS sc, saat 17:00'de, 30 gün), dimetilsülfoksit grubu (DMSO 100µl/bw ip, saat 17:00'de, 30gün), melatonin (MEL) grubu (10mg/kg+etanol-PBS sc, saat 17:00'de, 30 gün), Curcumin (CUR) (30mg/kg+DMSO ip, saat 17:00'de, 30 gün) ve MEL+CUR grubu.

MEL, CUR ve MEL+CUR çalışma gruplarında hipokampus doku MDA düzeyleri PBS kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken ($p<0,05$); CUR ve MEL+CUR gruplarındaki hipokampus doku GSH düzeylerinin PBS ve DMSO kontrol gruplarına kıyasla anlamlı olarak arttığı bulundu ($p<0,05$). Ayrıca; CUR ve MEL+CUR uygulaması yapılan her iki grupta da MDA ve GSH düzeyleri arasında negatif koreleasyon bulundu (sırasıyla $r(6) = -0,74$; $p=0,05$ ve $r(6) = -0,78$; $p<0,05$). CUR, MEL+CUR ve DMSO uygulaması yapılan gruplar, PBS kontrol grubu ve MEL uygulaması yapılan çalışma grubuyla karşılaştırıldığında hipokampal bcl2/beta aktin oranının anlamlı olarak azaldığı bulundu ($p<0,05$).

Sonuç olarak, melatonin uygulaması radikal hasar düzeyini anlamlı düzeyde azaltırken, curcumin, curcumin ve melatoninin birlikte uygulanması radikal hasar düzeyini azaltmakla beraber GSH düzeyini de arttırmıştır. Ayrıca; Curcumin, curcumin ve melatoninin birlikte uygulanması bcl-2 düzeylerini de azaltmıştır. Dolayısıyla melatonin ve curcumin gibi antioksidanların orta yaşlardan itibaren kullanılması, yaşlanma sürecinden en çok etkilenen hipokampus gibi nöral yapıları nörodejeneratif hasarlara karşı korumada etkili olabilir.

Anahtar kelimeler: Yaşlanma, oksidatif stres, melatonin, curcumin, hipokampus, bcl-2

8. SUMMARY

THE RELATIONSHIP BETWEEN OXIDATIVE STRESS AND BCL-2 IN HIPPOCAMPUS OF OLDER RATS

YAŞLI SIÇANLARDA HİPOKAMPUSTA OKSİDATİF STRES VE BCL-2 İLİŞKİSİ

In aging process, the production of radicals in several tissues increases while antioxidant capacity reduces. This fact is observed in neurodegenerative diseases in various brain regions including hippocampus. Melatonin, which is known as a powerful scavenger of radicals, significantly decreases with aging. Curcumin is a polyphenol which has anti-inflammatory, antiproliferative and antioxidant effects. Bcl-2, which takes a role in regulation of cellular redox state, is identified with antioxidant and antiapoptotic features.

The aim of the present study was to investigate the impact of melatonin and curcumin treatments on MDA which is an oxidative stress indicator; GSH, which function as an antioxidant system indicator; and bcl-2 which is a regulator of cellular redox status. In this respect, MDA, GSH and bcl-2 was assessed by using TBARS, modified Ellman and Western Blott techniques, respectively. Following the approval of the ethical committee, Wistar rats divided 5 groups (13 month-aged, n=30) and they were housed under laboratory conditions with 12 h-light/dark cycle. These groups were control group (1% ethanol-PBS sc, at 17:00, for 30 days), dimethyl sulfoxide (DMSO 100µl/bw ip, at 17:00, for 30 days), melatonin (MEL-10mg/kg+ethanol-PBS sc, at 17:00, for 30 days), curcumin (CUR-30mg/kg+DMSO ip, at 17:00, for 30 days) and MEL+CUR.

Comparing to the PBS-control group, MDA levels in hippocampus significantly decreased in treatment groups of MEL, CUR, MEL+CUR ($p<0,05$). Furthermore, the level of GSH increased in CUR and MEL+CUR groups, compared to PBS and DMSO groups ($p<0,05$). MDA and GSH were negatively correlated in CUR and MEL+CUR groups ($r(6)=-0,74$; $p=0,05$ ve $r(6)=-0,78$; $p<0,05$, respectively). Bcl2/beta actin ratio significantly decreased in CUR, MEL+CUR and DMSO groups, compared to PBS and MEL groups ($p<0,05$).

In sum, findings indicated that the treatment of melatonin alone decreased radical damage in hippocampus. However, the treatment of curcumin alone and of curcumin and melatonin together not only decreased the radical damage, but they also increased GSH level in hippocampus. Furthermore, the treatment of curcumin alone and of curcumin and melatonin together decreased bcl-2 level. Consequently, the treatment of the antioxidants such as melatonin and curcumin in adulthood might be an effective protector against neurodegenerative damages in hippocampus through the aging process.

Keywords: Aging, oxidative stress, melatonin, curcumin, hippocampus, bcl-2

9. KAYNAKLAR

1. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bio Essays* 2004; 26: 533-542.
2. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1nci baskı. Konya: Mimoza Yayınları 1995.
3. Tatar M, Bartke A, Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 2003; 1346-1351.
4. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
5. Higami Y, Shimokawa I. Apoptosis in the aging process. *Cell Tissue Res* 2000; 301: 125-32.
6. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287: 1433-8.
7. Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5263-7.
8. Siqueira IR, Fochesatto C, Silva Torres ILS, Dalmaz C, Netto CA. Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. *Life Sciences* 2005; 78: 271-278.
9. Navarro A, Lo'pez-Cepero J, Ba'ndez MJ, Sa'nchez-Pino MJ, Go'mez C, Cadenas E, et al. Hippocampal mitochondrial dysfunction in rat aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294: 501-509.

10. Pugazhenth S, Nesterova A, Jambal P, Audesirk G, Kern M, Cabell L. Oxidative stress-mediated down-regulation of bcl-2 promoter in hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry* 2003; 84: 982-996.
11. Savory J, Rao JK, Huang Y, Letada PR, Herman MM. Age-related hippocampal changes in Bcl-2:Bax ratio, oxidative stress, redox-active iron and apoptosis associated with aluminum-induced neurodegeneration: Increased susceptibility with aging. *Neurotoxicology* 1999; 20(5): 805-817.
12. Reiter RJ. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur J Endocrinol* 1996; 134: 412-420.
13. Hardeland R, Reiter RJ. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17: 347-356.
14. Benot S, Goberna R, Reither RJ, Garsio-Mourino E, Osuna C, Guerrero JM. Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. *J Pineal Res* 1999; 27: 59-64.
15. Sreejayan N, Rao MNA, Priyadarsini KI, Devasagayam TPA. Inhibition of radiation induced lipid peroxidation by curcumin. *Int J Pharm* 1997; 151: 127-130.
16. Jagetia GC, Rajanikant GK. Role of curcumin, a naturally occurring phenolic compound of turmeric in accelerating the repair of excision wound, in mice whole-body exposed to various doses of gamma-radiation. *J Surg Res* 2004; 120: 127-38.

17. Devasena T, Rajasekaran KN, Menon VP. Bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione (a curcumin analog) ameliorates DMH-induced hepatic oxidative stress during colon carcinogenesis. *Pharmacol Res* 2002; 46: 39-45.
18. Baydas G, Reiter RJ, Akbulut M, Tuzcu M, Tamer S. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience* 2005;135(3): 879-86.
19. Nedzvetski V, Kyrychenko S, Baydas G. Thinner Exposure and Memory and Learning Deficits. *NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security* 2012; 241-249.
20. Bala K, Tripathy BC, Sharma D. Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. *Biogerontology* 2006; 7: 81-89.
21. Pan R, Qiu S, Lu D, Dong J. Curcumin improves learning and memory ability and its neuroprotective mechanism in mice. *Chin Med J* 2008;121(9): 832-839.
22. Hayflick L. Living forever and dying in the attempt. *Exp Gerontol* 2003; 38: 1231-41.
23. Hayflick L. Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1100: 1-13.
24. Suresh ISR. Theories of biological aging: Genes, proteins and free radicals. *Free Radical Research* 2006; 40(12): 1230-1238.

25. Hayflick L. Anti-Aging is an oxymoron. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2004; 573-578.
26. Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev* 1990; 65: 375-98.
27. Weinert BT, Timiras PS. Invited Review: Theories of aging. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1706-1716.
28. Timiras PS. Biological perspectives on aging. *Am Sci* 1978; 66: 605-613.
29. Timiras PS. *Physiological Basis of Aging and Geriatrics*. 3 rd ed. FL: CRC; 2003.
30. Medawar PB. *An Unsolved Problem in Biology*. London: Lewis; 1952.
31. Partridge L, Gems D. Mechanisms of ageing: public or private? *Nat Rev Genet* 2002; 3: 165-175.
32. Sgro CM, Partridge LA. Delayed wave of death from reproduction in *Drosophila*. *Science* 1999; 286: 2521-2524.
33. Kirkwood TBL, Drenos F. Modelling the disposable soma theory of ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 2005; 126: 99-103.
34. Kirkwood TBL. Evolution of ageing mechanisms of ageing and development 2002; 123: 737-745.

35. Pletcher SD, Macdonald SJ, Marguerie R, Certa U, Stearns SC, Goldstein DB, et al. Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 2002; 12: 712-723.
36. Weindruch R, Kayo T, Lee CK, Prolla TA. Gene expression profiling of aging using DNA microarrays. *Mech Ageing Dev* 2002; 123: 177-193.
37. Zou S, Meadows S, Sharp L, Jan LY, Jan YN. Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 13726-13731.
38. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-636.
39. Campisi J. Cellular senescence and cell death, *Physiological Basis of Aging and Geriatrics*. 3 rd ed. FL: CRC; 2003.
40. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997; 91: 25-34.
41. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300.
42. Udelsman R, Blake MJ, Stagg CA, Li DG, Putney DJ, Holbrook NJ. Vascular heat shock protein expression in response to stress, endocrine and autonomic regulation of this age-dependent response. *J Clin Invest* 1993; 91: 465-473.
43. Cannon WB. *The Wisdom of the Body*. New York: Norton; 1932.

44. Monti DA, Benedictis DG. The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol* 2000; 35: 879-896.
45. George AJ, Ritter MA. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today* 1996; 17: 267-272.
46. Ginaldi L, Sternberg H. The immune system, *Physiological Basis of Aging and Geriatrics*. 3 rd ed. FL: CRC; 2003.
47. Pearl R. The rate of living, being an account of some experimental studies on the biology of life duration. London: University of London Press; 1928.
48. Rubner M. Das Problem der Lebensdauer und seine Beziehung zu Wachstum und Ernahrung [The problem of longevity and its relation to growth and nutrition]. Munich: Oldenburg; 1908.
49. Goldsmith TC. Aging as an evolved characteristic-Weismann's theory reconsidered. *MedHypotheses* 2004; 62: 304-8.
50. Goldsmith TC. Aging, evolvability, and the individual benefit requirement; medical implications of aging theory controversies. *J Theor Biol* 2008; 252: 764-8.
51. Campbell JA. Effects of oxygen pressure as influenced by external temperature, hormones, and drugs. *J Physiol* 1938; 92: 29-30.
52. Gomberg M. An instance of trivalent carbon: triphenyl-methyl. *J Am Chem Soc* 1900; 22: 757-771.

53. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen Poisoning and X-Irradiation: A Mechanism in Common. *Science* 1954; 119: 623-626.
54. Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5: 557-61.
55. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.
56. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
57. Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 1972; 20: 145-7.
58. Richter C. Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett* 1988; 241: 1-5.
59. Velarde MC, Flynn JM, Day NU, Melov S, Campisi J. Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging* 2012; 4(1): 3-12.
60. Perez VI, Buffenstein R, Masamsetti V, Leonard S, Salmon AB, Mele J, et al. Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *PNAS* 2009; 106 (9): 3059-3064.

61. Petti AA, Crutchfield CA, Rabinowitz JD, Botstein D. Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial function. *PNAS* 2011; 108 (45): E1089-E1098
62. Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 1994; 14: 5147-5159.
63. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets. *British Journal of Pharmacology* 1990; 101: 325-328.
64. Poli G, Cheeseman KH, Diamani MV, Slater TF. Lipid peroxidation products; formation, chemical properties and biological activities. Oxford: IRL Press; 1985.
65. Casini A, Ferrali M, Pompelam A, Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. *Am J Pathol* 1986; 123: 520-530.
66. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* 2011; 711: 193-201.
67. Powell CL, Swenberg JA, Rusyn I. Expression of base excision DNA repair genes as a biomarker of oxidative DNA damage. *Cancer Letters* 2005; 229: 1-11.
68. Mark EO, Yi L, Kaplana P, Bharat BY, Hector HP, Jerzy L, Gjumrakch A. Antioxidants in Health, Disease and Aging. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* 2011; 10(16): 192-207.

69. Caroch M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chemical Toxicology 2012; 5G: 11.
70. Schmidt MM, Dringen R. Glutathione (GSH) Synthesis and Metabolism. Advances in Neurobiology 2012; 4(5): 1029-1050.
71. Floyd AR. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. Proc Soc Exp Biol Med 1999; 222: 236-245.
72. Floyd AR, Hensley K. Oxidative stress in brain aging Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. Neurobiology of Aging 2002; 23: 795-807.
73. Bredesen D, Rammohan VR, Mehlen P. Cell death in the nervous system. Nature 2006; 443; 19: 796-802.
74. Harman D. Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging. Ann N Y Acad Sci 2006; 1067: 454-460.
75. Venkateshappa C, Harish G, Mahadevan A, Bharath SM, Shankar SK. Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's Disease. Neurochem Res 2012; 37: 1601-1614.
76. Akbulut KG, Gonul B, Akbulut H. Exogenous melatonin decreases age-induced lipid peroxidation in the brain. Brain Res 2008; 1238: 31-35.

77. Campisi J, Fagagna FA. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 729-40.
78. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasdemir E, et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path. *Gerontology* 2008; 54: 92-9.
79. Mark AB, Ekaterina LS, Svetlana NM, Yegor E. Telomere length is a biomarker of cumulative oxidative stress, biologic age, and an independent predictor of survival and therapeutic treatment requirement associated with smoking behavior. *American Journal of Therapeutics* 2011; 18(6); 209-226.
80. Akbulut KG, Gönül B, Akbulut H. Differential effects of pharmacological doses of melatonin on malondialdehydegutathione levels in youngold rats. *Gerontology* 1999; 45(2): 6771.
81. Öztürk G, Akbulut KG, Güney Ş, Acuna-Castroviejo D. Age-related changes in the rat brain mitochondrial antioxidative enzyme ratios: Modulation by melatonin. *Experimental Gerontology* 2012; 47(9): 706-711.
82. Floyd RA, Towner RA, He T, Hensley K, Maples KR. Translational research involving oxidative stress and diseases of aging. *Free Radical Biology and Medicine* 2011; 51(5): 931-941.
83. Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1994; 263: 1128–30.

84. Vanfleteren JR, Vrese AD. Rate of aerobic metabolism and superoxide production rate potential in nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Zool* 1996; 274: 93-100.
85. Serra V, Zglinicki T, Lorenz M, Saretzki G. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem* 2003; 278: 6824-30.
86. Zhang YQ, Ikeno Y, Qi WB, Chaudhuri A. Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity. *J Gerontol A Biol* 2009; 64: 1212-20.
87. Perez VI, Van Remmen H, Bokov A, Epstein CJ. The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell* 2009; 8: 73-5.
88. Jang YC, Perez VI, Song W, Lustgarten MS. Overexpression of Mn superoxide dismutase does not increase life span in mice. *J Gerontol A-Biol* 2009; 64: 1114-25.
89. Corbi G, Conti V, Scapagnini G, Filippelli A, Ferrara N. Role of sirtuins, calorie restriction and physical activity in aging. *Front Biosci* 2012; 4: 768-78.
90. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982; 17: 229-259.
91. Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicological Sciences* 2011; 119(1): 3-19.

92. Meng SJ, Yu LJ. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 1509-1526.
93. Hajnóczky G, Davies E, Madesh M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 304(3): 445-454.
94. Zhivotovsky B, Sten Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death Community. *Cell Calcium* 2011; 50: 211-221.
95. Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 337-43.
96. Kim MJ, Jo DG, Hong GS, Kim BJ, Lai M, Cho DH, et al. Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 9870-9875.
97. Minarowska A, Mirowski L, Karwowska A, Gacko M. Regulatory role of cathepsin D in apoptosis. *Folia histochemica et cytobiologica* 2007; 45(3): 159-163.
98. Moujalled D, Weston R, Anderton H, Ninnis R, Goel P, Coley A, et al. Cyclic-AMP-dependent protein kinase A regulates apoptosis by stabilizing the BH3-only protein Bim. *EMBO* 2011; 12: 77-83.
99. Reyland ME. Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci* 2009; 14: 2386-99.

100. Lia W, Laskara A, Sultanaa N, Osmana E, Ghosha M, Lia Q, et al. Cell death induced by 7-oxysterols via lysosomal and mitochondrial pathways is p53-dependent. *Free Radical Biology and Medicine* 2012; (in press)
101. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2011; 351: 41-58.
102. Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 2002; 111: 331-342.
103. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 405-413.
104. Malhotra JD, Kaufman RJ. ER Stress and its functional link to mitochondria: role in cell survival and death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3: a004424.
105. Minamino T, Kitakaze M. ER stress in cardiovascular disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2010; 48(6): 1105-1110.
106. Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nature Immunology* 2009; 10(4): 348-355.
107. Waterhouse NJ, Sedelies KA, Browne KA, Wowk ME, Newbold A, Sutton VR, et al. A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2005; 280(6): 4476-82.

108. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 47-59.
109. Shamas-Din A, Brahmbhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 508-520.
110. Laulier C, Lopez BS. The secret life of Bcl-2: Apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. *Mutation Research* 2012; 751: 247-257.
111. Hetz C, Glimcher L. The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. *Trends Cell Biol* 2008; 18: 38-44.
112. Steinman HM. The bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant. *The Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 3487-3490.
113. Jang JH, Surh YJ. Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1371-1379.
114. Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, et al. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 1994; 13(4): 1017-1030.
115. Pollack M, Phaneuf S, Dirks A. Role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle and heart. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 959: 1.

116. Susnow N, Zeng L, Margineantu D, Hockenbery DM. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Seminars in Cancer Biology* 2009; 19: 42-49.
117. Kaufmann JA, Bickford PC, Taglialetela G. Oxidative-stress-dependent up-regulation of Bcl-2 expression in the central nervous system of aged Fisher-344 rats. *Journal of Neurochemistry* 2001; 76: 1099-1108.
118. Satoh T, Nakatsuka D, Watanabe Y, Nagata I, Kikuchi H, Namura S. Neuroprotection by MAPK/ERK kinase inhibition with U0126 against oxidative stress in a mouse neuronal cell line and rat primary cultured cortical neurons. *Neuroscience Letters* 2000; 288(2): 163-166.
119. Kanan K, Sushil K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000; 7(3): 153-163.
120. Pellmar TC, Hollinden GE, Sarvey JM. Free radicals accelerate the decay of long-term potentiation in field CA1 of guinea pig hippocampus. *Neuroscience* 1991; 44: 353-359.
121. Knapp LT, Klan E. Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: Contributory or inhibitory? *Journal of Neuroscience Research* 2002; 70: 1-7.
122. Hildeman DA, Mitchell T, Arrow B, Wojciechowski S, Kappler J, Marrack P. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *PNAS* 2003; 100: 25.
123. Fu J, Zhao SD, Liu H, Yuan Q, Liu J, Zhang Y, et al. Melatonin promotes proliferation and differentiation of neural stem cells subjected to hypoxia in vitro. *Journal of Pineal Research* 2011; 51(1): 104-112.

124. Hochman A, Sternin H, Gorodin S, Korsmeyer S, Ziv J, Melamed E, et al. Enhanced oxidative stress and altered antioxidants in brains of bcl-2-deficient mice. *Journal of Neurochemistry* 2002; 71(2): 741-48.
125. Cand E, Verdeti J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. *Free Radical Biology and Medicine* 1989; 7(1): 59-63.
126. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signalling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(2): 139-163.
127. Szczepanik M. Melatonin and its influence on immune system. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58(6): 115-124.
128. Reiter RJ. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12(2): 151-180.
129. Şener G. Karanlığın hormonu: Melatonin. *Marmara Eczacılık Dergisi* 2010; 14: 112-120.
130. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol* 2008; 85: 335-353.
131. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, et al. Melatonin signaling and cell protection function. *The FASEB Journal* 2010; 24: 3603-3624.

132. Reppert SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step in to the light: Cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17: 100-102.
133. Ianas O, Olivescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative processes. *Rom J Endocrinol* 1991; 29: 117-123.
134. Reiter RJ. Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 103-116.
135. Hardeland R, Cardinali DP, Sirinivasan V, Warren SD, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin - A pleiotropic, orchestrating regular molecule. *Progress in Neurobiology* 2011; 93: 350-384.
136. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin: A potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1: 57-60.
137. Reiter RJ, Carneiro RG, Oh S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997; 29: 363-372.
138. Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals. *Braz J Med Bio Res* 1993; 26: 1141-55.
139. Radogna F, Paternoster L, Nicola M, Cerella C, Ammendola S, Bedini A, et al. Rapid and transient stimulation of intracellular reactive oxygen species by melatonin in normal and tumor leukocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 239: 37-45.

140. Cristofanon S, Uguccioni F, Cerella C, Radogna F, Dicato M, Ghibelli L, et al. Intracellular prooxidant activity of melatonin induces a survival pathway involving NF-kB activation. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1171: 472-478.
141. Bonnefont-Rousselot D, Collin F. Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology* 2010; 278(1): 55-67.
142. Bondy SC, Li H, Zhou J, Wu M, Bailey JA, Lahiri DK. Melatonin alters age-related changes in transcription factors and kinase activation. *Neurochem Res* 2010; 35: 2035-2042.
143. Venkataramanujam S, George M, Ruth ER, Mahaneem M. Immune Mechanism, Aging, Season and Diseases: Modulatory Role of Melatonin. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents - Medicinal Chemistry* 2012; 12(14): 289-302.
144. Oaknin-Bendahan S, Anis Y, Nir I, Zisapel N. Effect of longterm administration of melatonin and a putative antagonist on the ageing rat. *Neuro Report* 1995; 6: 785-788.
145. Poeggeler B. Melatonin, aging, and age-related diseases. Perspectives for prevention, intervention and therapy. *Endocrine* 2005; 27: 201-212.
146. Reither RJ, The melatonin rhythm: both a clock and a calender. *Experientia*, 1993; 49: 654-1664.

147. Stokkan KA, Reither RJ, Neonaka KO, Lerchl A, Yu BP, Vaughan MK. Food restriction retards aging of the pineal gland. *Brain Res* 1991; 545: 66-72.
148. Henden T, Stokkan KA, Reiter RJ, Nonaka KO, Lerchl A. Age-associated reduction in pineal beta-adrenergic receptor density is prevented by life-long food restriction in rats. *Biol Signals* 1992; 1: 34-39.
149. Maestroni GJ, Conti A, Lissoni P. Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4. *Cancer Res* 1994; 54: 4740-4743.
150. Akbulut KG, Akbulut H, Akgun N, Gonul B. Melatonin decreases apoptosis in gastric mucosa during aging. *Aging Clin Exp Res* 2012; 24(1):15-20.
151. Yoo YM, Yim SV, Kim SS, Jang HY, Lea HZ, Hwang GC, et al. Melatonin suppresses NO-induced apoptosis via induction of Bcl-2 expression in PGT-immortalized pineal cells. *J Pineal Res* 2002; 33: 146-150.
152. Yalcin A, Kanit L, Sozmen EY. Altered gene expressions in rat hippocampus after kainate injection with or without melatonin pre-treatment. *Neurosci Lett* 2004; 359: 65-68.
153. Esposito E, Genovese T, Caminiti R, Bramanti P, Meli R, Cuzzocrea S. Melatonin reduces stress-activated/mitogen-activated protein kinases in spinal cord injury. *J Pineal Res* 2009; 46: 79-86.

154. Ma J, Shaw VE, Mitrofanis J. Does melatonin help save dopaminergic cells in MPTP-treated mice? *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15: 307-314.
155. Tapias V, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Camacho E, Carrion MD, et al. Melatonin and its brain metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. *J Neurosci Res* 2009; 87: 3002-3010.
156. Koh PO. Melatonin attenuates the cerebral ischemic injury via the MEK/ERK/p90RSK/bad signaling cascade. *J Vet Med Sci* 2008; 70: 1219-1223.
157. Wang X, Figueroa BE, Stavrovskaya IG, Zhang Y, Sirianni AC, Zhu S, et al. Methazolamide and melatonin inhibit mitochondrial cytochrome C release and are neuroprotective in experimental models of ischemic injury. *Stroke* 2009; 40: 1877-1885.
158. Martinez-Cruz F, Pozo D, Osuna C, Espinar A, Marchante C, Guerrero JM. Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: prevention by melatonin, vitamin E and vitamin C. *J Neurosci Res* 2002; 69: 550-558.
159. Wang X. The antiapoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci Ther* 2009; 15: 345-357.
160. Wisessmith W, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P, Chetsawang B. Melatonin reduces induction of Bax, caspase and cell death in methamphetamine-treated human neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells. *J Pineal Res* 2009; 46: 433-440.

161. Chetsawang B, Chetsawang J, Govitrapong P. Protection against cell death and sustained tyrosine hydroxylase phosphorylation in hydrogen peroxide- and MPP-treated human neuroblastoma cells with melatonin. *J Pineal Res* 2009; 46: 36-42.
162. Huang JY, Hong YT, Chuang JI. Fibroblast growth factor 9 prevents MPP-induced death of dopaminergic neurons and is involved in melatonin neuroprotection in vivo and in vitro. *J Neurochem* 2009; 109: 1400-1412.
163. Radogna F, Nuccitelli S, Mengoni F, Ghibelli L. Neuroprotection by melatonin on astrocytoma cell death. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1171: 509-513.
164. El-Sawalhi MM, Darwish HA, Mausouf MN, Shaheen AA. Modulation of age related changes in oxidative stress markers and energy status in the rat heart and hippocampus: a significant role for ozone therapy. *Cell Biochem Funct* 2012.
165. Kwong-Man N, Chi-Fai L, Man-Lung F. Melatonin reduces hippocampal β -amyloid generation in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Brain Research* 2010; 1354:163-171.
166. Assaf N, Shalby AB, Khalil WKB, Ahmed HH. Biochemical and genetic alterations of oxidant/antioxidant status of the brain in rats treated with dexamethasone: protective roles of melatonin and acetyl-L-carnitine. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2012; 68: 77-90.
167. Tresguerres JA, Kireev R, Tresguerres AF, Borrás C, Vara E, Ariznavarreta C. Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 108: 318-326.

168. Kara İ. Brain Aging: Rejuvenation & Regeneration. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2009; 29: 63-67.
169. Ramirez-Rodriguez G, Klempin F, Babu H, Benitez-King G, Kempermann G. Melatonin modulates cell survival of new neurons in the hippocampus of adult mice. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34: 2180-2191.
170. Kong X, Li X, Cai Z, Yang N, Liu Y, Shu J, et al. Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells. *Cell Mol Neurobiol* 2008; 28: 569-579.
171. Talaei SA, Sheibani V, Salami M. Light deprivation improves melatonin related suppression of hippocampal plasticity. *Hippocampus* 2010; 20: 447-455.
172. El-Sherif Y, Tesoriero J, Hogan MV, Wieraszko A. Melatonin regulates neuronal plasticity in the hippocampus. *Journal of Neuroscience Research* 2003; 72(4): 454-460.
173. Ozcan M, Yilmaz B, Carpenter DO. Effects of melatonin on synaptic transmission and long-term potentiation in two areas of mouse hippocampus. *Brain Research* 2006; 1111(1): 90-94.
174. Pandya U, Saini MK, Jin GF, Awasthi S, Godley BF, Awasthi YC. Dietary curcumin prevents ocular toxicity of naphthalene in rats. *Toxicol Lett* 2000; 115: 195-204.

175. Choudhary D, Chandra D, Kale RK. Modulation of radioresponse of glyoxalase system by curcumin. *J Ethnopharmacol* 1999; 64: 1-7.
176. Priyadarsini KI. Free radical reactions of curcumin in membrane models. *Free Radic Biol Med* 1997; 23: 838-43.
177. Belakavadi M, Salimath BP. Mechanism of inhibition of ascites tumor growth in mice by curcumin is mediated by NF-kB and caspase activated DNase. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2005; 273: 57-67.
178. Oetari S, Sudibyo M, Commandeur JNM, Samhoedi R, Vermeulen NPE. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. *Biochemical Pharmacology* 1996; 51(1): 39-45.
179. Piper JT, Singhal SS, Salameh MS, Torman RT, Awasthi YC, Awasthi S. Mechanism of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzyme in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 445-456.
180. Surh YJ. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res* 1999; 428: 305-327.
181. Watanabe S, Fukui T. Suppressive effect of curcumin on trichloroethane-induced oxidative stress. *J Nutr Sci Vitaminol* 2000; 46: 230-234.

182. Al-Omar FA, Nagi MN, Abdulgadir MM, Al-Joni KS, Al-Majed AA. Immediate delayed treatments with curcumin prevents forebrain ischemia-induced neuronal damage and oxidative insult in the rat hippocampus. *Neurochem Res* 2006; 31: 611-618.
183. Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole MG. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *The Journal of Neuroscience* 2001; 21(21): 8370-8377.
184. Kim JS, 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): 14497-14505.
185. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. 3üncü baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2001. 318-321.
186. Songur A, Ozen OA, Sarsılmaz M. Hipocampus. *J Med Sci* 2001; 21: 427-431.
187. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji*. Cavuşoğlu H (Çev. Ed.), 1.Baskı. İstanbul: Nobel; 2001.
188. Vanderwolf CH. The hippocampus as an olfacto-motor mechanism: were the classical anatomists right after all?. *Behav Brain Res* 2001; 127 (1-2): 25-47.

189. Aykac G, Uysal M, Yalçın AS, Kocak-Toker N, Sivas A, Oz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 1985; 36: 71-76.
190. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
191. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1979; 76 (9): 4350-54.
192. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A". *Analytical Biochemistry* 1981; 112 (2): 195-203.
193. Rosales-Corral SA, Acuña-Castroviejo D, Coto-Montes A, Jose A, Boga JA, Manchester LC, et al. Alzheimer's disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *Pineal Research* 2012; 52(2): 167-202.
194. Yan W, Ai-Qun Z, Maria SMW, Helen WLL, Sheng-Xi W, David TY. Changes of apoptosis-related proteins in hippocampus of SAM mouse in development and aging. *Neurobiology of Aging* 2006; 27: 782.e1-782.e10.

195. Rasmussen DD, Mitton DR, Larsen SA, Yellon SM. Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. *J Pineal Res* 2001; 31: 89-94.
196. Lu C, Mattson MP. Dimethyl sulfoxide suppresses NMDA- and AMPA-induced ion currents and calcium influx and protects against excitotoxic death in hippocampal neurons. *Experimental Neurology* 2001; 170: 180-185.
197. Di Giorgio AM, Hou Y, Zhao X, Zhang B, Lyeth BG, Russel MJ. Dimethyl sulfoxide provides neuroprotection in a traumatic brain injury model. *Restor Neurol Science* 2008; 26(6): 501-507.

10. EKLER



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/133-12275
KONU :

30.06/2011

Sayın

Prof.Dr.K.Gonca AKBULUT
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu K.Gonca AKBULUT, Arzu KESKİN AKTAN, Çiğdem YAZICI MUTLU, Şevin GÜNEY ve Hakan AKBULUT'tan oluşan, G.Ü.ET-11.055 kod numaralı ve "Sirtuin'in beyinde apoptoz üzerine etkisi" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-11.055 and entitled "The Effects of Sirtuin Apoptosis of Brain" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı: : Arzu

Soyadı: : KESKİN AKTAN

Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara, 29.04.1982

Eğitimi:

Lisans: 2004, Hacettepe Üniversitesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Y.O,
Ankara.

Lise: 2000, Batıkent Lisesi- Yabancı Dil Ağırlıklı, Ankara.

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: Türkiye Fizyoterapistler Derneği (TFD)
Geriatri Fizyoterapistleri Derneği (GFD)

12. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana her konuda göstermiş olduğu sonsuz sabır ve desteğinden ötürü danışmanım Prof. Dr. Gonca Akbulut'a ve eğitimime katkı sağlayan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aydan Babül ve değerli hocalarım Prof. Dr. Deniz Erbaş, Prof. Dr. Lamia Pınar, Prof. Dr. Sibel Dinçer, Prof. Dr. Çiğdem Özer ve Yrd. Doç. Dr. Sevin Güney'e şükranlarımı sunarım. Çalışmam sırasında bana öğrettikleri ve çalışmamın her aşamasındaki yardımlarından dolayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Prof. Dr. Hakan Abulut'a teşekkür ederim. Ayrıca aynı dönemlerde yüksek lisans yaptığım arkadaşım Çiğdem Yazıcı Mutlu'ya tüm çalışma sürecimde bana verdiği destekten dolayı teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca benden sabır ve desteklerini esirgemeyen eşim Yrd. Doç. Dr. Timuçin Aktan'a, tüm aileme ve arkadaşım Saadet Kaygusuz'a teşekkür ederim.