

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

**YAŞLANMA SÜRECİNDE PANKREAS DOKUSUNDA NO<sub>x</sub>, MDA, GSH  
DÜZEYLERİ ve MELATONİNİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HAKAN YÜZÜAK**

Tez Danışmanı

Doç. Dr. KAZİME GONCA AKBULUT

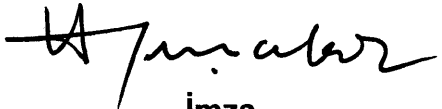
ANKARA  
Haziran 2008

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 : 03 / 07 / 2008**

  
**İmza  
Prof.Dr. Deniz ERBAŞ  
Gazi Üniversitesi  
Jüri Başkanı**

  
**İmza  
Prof.Dr. Hakan FIÇICILAR  
Ankara Üniversitesi**

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

## İÇİNDEKİLER

|                                                      |            |
|------------------------------------------------------|------------|
| <b>Kabul ve Onay</b>                                 | <b>I</b>   |
| <b>İçindekiler</b>                                   | <b>II</b>  |
| <b>Şekiller</b>                                      | <b>V</b>   |
| <b>Tablolar</b>                                      | <b>VI</b>  |
| <b>Semboller, Kısaltmalar</b>                        | <b>VII</b> |
| <br>                                                 |            |
| <b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b>                              | <b>1</b>   |
| <br>                                                 |            |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                             | <b>3</b>   |
| 2.1. Yaşlanma                                        | 3          |
| 2.1.1. Yaşlanmanın Tanımı                            | 3          |
| 2.1.2. Yaşlanma Teorileri                            | 3          |
| 2.1.2.1. İç Etkenler ( Gelişimsel-Kalıtsal Etkenler) | 3          |
| 2.1.2.1.1. Uzun Yaşam Genleri Teorisi                | 4          |
| 2.1.2.1.2. Nöroendokrin teori                        | 4          |
| 2.1.2.1.3. İmmünolojik Teori                         | 5          |
| 2.1.2.1.4. Hücrel Yaşlanma Teorisi                   | 5          |
| 2.1.2.1.5. Hücre Ölümü Teorisi                       | 6          |
| 2.1.2.2. Dış Etkenler (Stastik etkenler)             | 6          |
| 2.1.2.2.1. Somatik Mutasyon ve DNA Tamiri Teorisi    | 7          |
| 2.1.2.2.2. Ölümcül Hata Teorisi                      | 7          |
| 2.1.2.2.3. Proteinlerin Değişikliğe Uğraması Teorisi | 7          |
| 2.1.2.2.4. Serbest Radikal Teorisi                   | 8          |
| 2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar            | 8          |
| 2.2.1. Serbest radikaller                            | 8          |
| 2.2.1.1 Serbest Radikallerin Oluşumu                 | 9          |
| 2.2.1.2 Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri  | 10         |
| 2.2.1.2.1 Oksidatif Stres ve Yaşlanma                | 15         |
| 2.2.1.3 Nitrik Oksit                                 | 18         |
| 2.2.1.3.1. Yaşlanma ve Nitrik Oksit                  | 21         |

|                                                         |           |
|---------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.2. Antioksidanlar                                   | 23        |
| 2.2.2.1 Glutasyon                                       | 25        |
| 2.2.2.2 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)                   | 26        |
| 2.2.2.3 Glutasyon Redüktaz                              | 27        |
| 2.2.2.4 Glutasyon S Transferazlar                       | 27        |
| 2.2.2.5. Antioksidanlar Ve Yaşlanma                     | 28        |
| 2.3. Melatonin                                          | 28        |
| 2.3.1. Melatonin Fizyolojisi                            | 28        |
| 2.3.1.1. Epifiz Bezi ve Melatonin                       | 28        |
| 2.3.1.2. Melatonin Sentez ve Metabolizması              | 29        |
| 2.3.1.3. Melatoninin Etki Yerleri                       | 33        |
| 2.3.1.4. Melatoninin Antioksidan Etkisi                 | 34        |
| 2.3.1.4.1. Melatoninin Direkt Antioksidan Etkisi        | 34        |
| 2.3.1.4.2. Melatoninin Prooksidan Enzim Aracılı Etkisi  | 36        |
| 2.3.1.4.3. Melatoninin Antioksidan Enzim Aracılı Etkisi | 36        |
| 2.3.1.5. Melatonin ve Yaşlanma                          | 37        |
| 2.4. Pankreas                                           | 39        |
| 2.4.1. Pankreas Fizyolojisi                             | 39        |
| 2.4.2. Yaşlanma ve Pankreas                             | 40        |
| 2.4.3. Oksidatif Stres ve Pankreas                      | 42        |
| 2.4.4. Melatonin ve İnsülin Sekresyonu                  | 43        |
| 2.4.5. Pankreas ve Melatonin                            | 45        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                               | <b>47</b> |
| 3.1. Araştırma Planı                                    | 47        |
| 3.2. Kullanılan Gereçler, Maddeler ve Denekler          | 49        |
| 3.3. Tayin Yöntemleri                                   | 49        |
| 3.3.1. Dokuda TBARS Tayin Yöntemi                       | 49        |
| 3.3.2. Dokuda Glutasyon Tayin Yöntemi                   | 50        |
| 3.3.3. Dokuda Nitrik Oksit Tayin Yöntemi                | 50        |
| 3.3.4. İstatistiksel Değerlendirme                      | 51        |

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>4. BULGULAR</b>        | <b>52</b> |
| 4.1. Dokuda MDA düzeyleri | <b>52</b> |
| 4.2. Dokuda NOx düzeyleri | <b>52</b> |
| 4.3. Dokuda GSH düzeyleri | <b>53</b> |
| <b>5. TARTIŞMA</b>        | <b>58</b> |
| <b>6. SONUÇ</b>           | <b>64</b> |
| <b>7. ÖZET</b>            | <b>65</b> |
| <b>8. SUMMARY</b>         | <b>67</b> |
| <b>9. KAYNAKÇA</b>        | <b>69</b> |
| <b>10. EKLER</b>          | <b>93</b> |
| 10.1. Teşekkür            | <b>93</b> |
| 10.2. Etik Kurul Onayı    | <b>94</b> |
| <b>11. ÖZGEÇMİŞ</b>       | <b>95</b> |

## **ŞEKİLLER**

|                                                                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Şekil 1. Serbest radikal aracılı oksidatif DNA hasarı.                                                                    | <b>17</b> |
| Şekil 2. Nitrik oksit (NO) kaynakları ve oluşumu.                                                                         | <b>22</b> |
| Şekil 3. Pinosit hücrelerindeki melatonin sentezi.                                                                        | <b>30</b> |
| Şekil 4. Melatoninin biyosentezi ve metabolize edilmesi.                                                                  | <b>32</b> |
| Şekil 5. Çeşitli dokulardaki melatonin reseptörlerinin (MT1 ve MT2) jel elektroforezi sonucu görünüşü.                    | <b>33</b> |
| Şekil 6. Melatoninin antioksidan etkisi.                                                                                  | <b>35</b> |
| Şekil 7 Yaşlanma etkisi ile melatonin sentezinin azalması.                                                                | <b>38</b> |
| Şekil 8 Melatoninin insülin sekresyonu üzerindeki etkisi.                                                                 | <b>44</b> |
| Şekil 9. Melatonin uygulanmayan ve uygulanan, genç ve orta yaşlı sıçanlarda pankreas dokusundaki MDA düzeyleri (nmol/g).  | <b>55</b> |
| Şekil 10. Melatonin uygulanmayan ve uygulanan, genç ve orta yaşlı sıçanlarda pankreas dokusundaki NOx düzeyleri (µmol/g). | <b>56</b> |
| Şekil 11. Melatonin uygulanmayan ve uygulanan, genç ve orta yaşlı sıçanlarda pankreas dokusundaki GSH düzeyleri (µmol/g). | <b>57</b> |

## **TABLÖLAR**

|          |                                                                                                                                                                                                                           |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Tablo 1. | Antioksidan Çeşitleri.                                                                                                                                                                                                    | <b>24</b> |
| Tablo 2. | Yaşlanmaya bağlı olarak karbonhidrat ve insülin metabolizmasında ki değişiklikler.                                                                                                                                        | <b>41</b> |
| Tablo 3. | Çalışma grupları ve özellikleri.                                                                                                                                                                                          | <b>47</b> |
| Tablo 4. | Melatonin uygulanmayan ve uygulanan, genç ve orta yaşlı sıçanlarda pankreas dokusundaki MDA; NOx ve GSH düzeylerinin ortalama değerleri $\pm$ standart hata ve istatistiksel olarak anlamlılığın ifadesi olan P değerleri | <b>54</b> |

## SEMBOLLER, KISALTMALAR

|                        |                                           |
|------------------------|-------------------------------------------|
| $^1\text{O}_2$         | Singlet Oksijen Radikali                  |
| 8-OHdG                 | 8-hidroksi deoksiguanozin                 |
| AAAD                   | Aromatik Aminoasit Dekarboksilaz          |
| AA-NAT                 | Aril Alkilamin N-Asetil transferaz        |
| AFMK                   | N1-asetil-N2-formil-5- metoksikinüramin   |
| AGE                    | İleri Glikolizasyon Son Ürünleri          |
| CAT                    | Katalaz                                   |
| CCK                    | Kolesistokinin                            |
| eNOS                   | Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz Enzimi     |
| ETZ                    | Elektron Transport Zinciri                |
| FAD                    | Flavin Adenin Dinükleotid                 |
| FMN                    | Flavin Mononükleotid                      |
| G6PD                   | Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz              |
| GH                     | Growth Hormon                             |
| GSH                    | Glutasyon                                 |
| GSH-Px                 | Glutasyon Peroksidaz                      |
| GST                    | Glutasyon S Transferazlar                 |
| $\text{H}_2\text{O}_2$ | Hidrojen Peroksit                         |
| HIOMT                  | Hidroksiindol-O-metiltransferaz           |
| IDO                    | İndolamin 2,3-Dioksijenaz                 |
| IP3                    | İnositol trifosfat                        |
| iNOS                   | İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Enzimi |
| LPO                    | Lipit Peroksidasyonu                      |
| MDA                    | Malondialdehid                            |
| MEL                    | Melatonin                                 |
| mtDNA                  | Mitokondriyal DNA                         |
| NADPH                  | Nikotinamid Adenin Dinükleotid            |
| NFkB                   | Nükleer Faktör Kapa B                     |
| NMDA                   | N-methyl-D-aspartate                      |

|                              |                                       |
|------------------------------|---------------------------------------|
| nNOS                         | Nöronal Nitrik Oksit Sentaz Enzimi    |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Nitrit                                |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | Nitrat                                |
| NOS                          | Nitrik Oksit Sentaz Enzimi            |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | Süperoksit Radikali                   |
| OH <sup>•</sup>              | Hidroksil Radikali                    |
| ONOO <sup>-</sup>            | Peroksinitrit Anyonu                  |
| PBS                          | Fosfat ile Tamponlanmış Tuz Çözeltisi |
| SOD                          | Süperoksit Dismutaz                   |
| TBARS                        | Tiobarbitürik Asit Reaktifi           |
| TNF- $\alpha$                | Tümör Nekroz Faktörü Alfa             |
| VCAM-1                       | Vasküler Cell Adhezyon Molekülü 1     |

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Yaşlanma sürecinin nasıl gerçekleştiği, insanlık tarihi boyunca merak konusu olmuştur. Bu nedenle bu konuya ilişkin birçok teori ortaya atılmıştır; bu teoriler arasında serbest radikal teorisi hala popüleritesini korumaktadır. Yapılarında eşleşmemiş elektron içeren atom veya bileşikler serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır.<sup>1,2</sup> Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen metabolitleri (ROM) meydana gelmektedir. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında ROM oluşmakta ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedir.<sup>3,4</sup> Serbest radikallerin DNA, protein, ve lipitler üzerinde oluşturduğu hasar ve birikim sonucunda yaşlanmaya yol açtığı belirtilmiştir.<sup>4-6</sup>

Yapılan çalışmalarda genellikle yaşlanma ile birlikte dokularda serbest radikal düzeyinde artış gözlenmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada lipit peroksidasyon ürünlerinin yaşlı sıçanlarda hem mide dokusunda hem de kan düzeylerinde gençlere göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur.<sup>7,8</sup> Ayrıca; yaşlanma ile sıçanlarda kalpte<sup>9</sup> ve karaciğerde<sup>10</sup>; insanda; beyin<sup>11</sup>, diyafram kasında<sup>12</sup> serbest radikal düzeyinde artış ve oksidatif hasar bildirilmiştir.

Melatonin (MEL), karanlıkta pineal bezden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur<sup>13</sup>. Birçok biyolojik etkisinin yanı sıra, güçlü bir radikal süpürücü özelliğe sahiptir. Bilinen tüm antioksidanlardan (mannitol, glutatyon, vit E, C gibi) daha güçlü serbest

radikal süpürücü özelliği vardır.<sup>14</sup> Yaşlanma ile birlikte melatonin düzeyinin azaldığı belirtilmiştir.<sup>15,16</sup> Melatonin düzeyinde görülen bu fizyolojik azalışa karşı ekzojen melatonin uygulanmasının yaşlanma ile birlikte artmış radikal hasarını önleyebileceği belirtilmiştir.<sup>17-19</sup>

Pankreas hem ekzokrin, hemde endokrin salgı yapan bir bezdir.<sup>20</sup> Pankreasın endokrin ve ekzokrin işlevleri yaş ilerledikçe azalır ve parenkimde yağ infiltrasyonu gözlenir.<sup>21</sup> Pankreas adacık hücrelerinde, antioksidan kapasitenin düşük olduğu bildirilmiştir. Farmakolojik dozlarda ekzojen olarak melatonin uygulanmasının oksidatif strese karşı pankreası koruyabileceği belirtilmiştir.<sup>22</sup> Caerulein ile oluşturulan deneysel pankreatitte; melatonin uygulanması yükselmiş MDA düzeyini azaltarak; pankreası oksidatif hasara karşı korumuştur.<sup>23</sup> Deneysel olarak oluşturulan pankreatitte melatonin uygulaması bozulan kan akımını yeniden düzenler.<sup>21,24</sup> Streptozin ve alloxan ile oluşturulan deneysel diabette melatonin uygulaması, pankreasta koruyucu etki gösterir.<sup>22,25</sup>

Yaşa bağlı olarak oluşan radikal hasarını önlemede melatonin uygulanması pankreası koruyucu etki gösterebilir; hipotezini test etmek amacıyla, bu çalışmada, farklı yaş gruplarında sıçanlar kullanarak, yaşlanma ile pankreas dokusunda oksidan hasarın göstergesi olarak kullanılabilen MDA düzeylerinin, oksidan hasara neden olabilen NOx düzeylerinin ve antioksidan sistemin elemanı olarak çalışan GSH düzeylerinin ekzojen melatonin uygulanması sonucu değişimlerini belirlemeyi amaçladık.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Yaşlanma**

#### **2.1.1. Yaşlanmanın Tanımı**

Canlılarda yaşlanma evrensel, ilerleyici ve geri dönüşümsüzdür. Anne karnından başlayarak yaşamın sonlanmasına kadar devam eden; zamana bağlı olarak, hastalık söz konusu olmaksızın ortaya çıkan anatomik yapı ve fizyolojik işlev değişiklikleridir.<sup>26</sup> Yaşlanmanın temel prensip ve özelliklerini açıklamaya çalışan fizyolojik mekanizmalar genellikle teori seviyesindedir ve hiç biri tek başına yaşlanmayı açıklamak için yeterli değildir. Bu teoriler aşağıda olduğu gibi sıralanabilir.<sup>27</sup>

#### **2.1.2. Yaşlanma Teorileri**

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

##### **2.1.2.1. İç Etkenler (Gelişimsel-Kalıtsal Etkenler)**

Yaşlanmanın kalıtsal olarak programlanmış gelişimsel mekanizmalarla kontrol edilen bölümünü oluşturur. Tek ve çift yumurta ikizleri ile yapılan çalışmalarla önemli bilgilere ulaşılmış olmasına rağmen; hala pek çok bilgiye ihtiyaç vardır.<sup>27</sup> İç etkenler teorilerinin başlıcaları aşağıda sıralanmıştır:

- Uzun Yaşam Genleri Teorisi
- Nöroendokrin Teori
- İmmunolojik Teori
- Hücresel Yaşlılık Teorisi
- Hücre Ölümü Teorisi

#### 2.1.2.1.1. Uzun Yaşam Genleri Teorisi

Bu teoriye göre organizmada meydana gelen hasarlar birikime neden olmaktadır. Oluşan bu hasara karşı genetik kontrol mekanizmaları ile yanıt oluşturulmazsa; yaşlılık gerçekleşmektedir. Bu mekanizmada genetik kontrolü oluşturan genlere “Uzun Yaşam Genleri” denilmektedir. Bu teoride hasar yaratabilecek oluşumlardan en önemlisi metabolik olaylardır.<sup>27</sup>

#### 2.1.2.1.2. Nöroendokrin teori

Yaşlanmanın sadece nöronal ve nöronlarla ilgili hormonal mekanizmalarda fonksiyonel azalmaya bağlı olarak geliştiği savunulur. Bu teorinin en önemli dayanağı; hipotalamo-hipofizer aksın büyümenin düzenlenmesinde ve yaşlanmanın temel mekanizmalarında yer alıyor olmasıdır. Özellikle kadınlarda üretkenlik sona erince bu aksın fonksiyonlarında da hızlı bir azalma olur. Bu teori hipofizektomi yapılmış farelerde de test edilmiş ve doğrulanmıştır. Bu teoride en önemli konu; ortaya çıkan bulgulardan hangisinin patolojik, hangisinin yaşlılığa bağlı değişiklik olduğunun çözülmemiş olmasıdır.<sup>27</sup>

Hipofiz bezi veya ilişkili yapıların hasarı sonucu meydana gelen, büyüme hormonu (GH) eksikliği sendromu vücut bileşiminde ve metabolizmasında yaşlanma benzeri değişiklikler oluşturur. Bu fenotipik benzerlikler kas kitlesi kaybı, özellikle abdomende yağ birikimi; hem total düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolün (LDL) dramatik artışının olduğu aterojenik lipid profili hem de azalmış kuvvet ve aerobik kapasite ilişkili değişiklikleri içerir.<sup>28</sup>

#### 2.1.2.1.3. İmmünolojik Teori

İmmünolojik teori iki temele dayanır;

**a)** Bağışıklık sisteminin fonksiyonel kapasitesi yaşla azalır. T-hücrelerinde mitojenlere cevap ve enfeksiyöz hastalıklara direnç azalır.

**b)** Otoimmün hastalıklar ve otoimmün fenomen yaşla artar.

Yaşlanma ile birlikte görülen timus bezinin involusyonu ve T hücre aracılı cevabındaki kademeli azalma yaşlanma sürecinin oluşmasında etkili olabilir.<sup>29</sup>

#### 2.1.2.1.4. Hücresel Yaşlanma Teorisi

Hücresel yaşlanmanın ve senesensin açıklanmasında hücre kültürleri en önemli araştırma materyalleridir. Ancak, olayın çok kompleks olması buna her zaman olanak tanımamaktadır. Hayflick ve Moorhead tarafından geliştirilen “replikatif senesens” özellikle fibroblastların yaşlanması konusunda önemli gelişmeler sağlamıştır. Replikatif yaşlanmayı inceleyen Leonard Hayflick, normal insan fibroblastlarının,

kabaca 50 hücre bölünmesi sonunda, gelişme ve bölünme yeteneklerini yitirdiğini bulmuştur. Yaşlanmış hücreler metabolik olarak aktif kalır ancak çoğalamazlar.<sup>30</sup> Senesens yaşıllığın karşılığı olarak; senescere'den (büyüme) köken alan kelimedir. Latince olan bu kelime olgunlaşma ile ölüm arasındaki tüm süreyi ifade eder. "Yaşlılık Bilimi" açısından ise, sadece ölümle sona eren hücresel düzeydeki büyüme kapasitesinin ifadesidir.<sup>31</sup> Yaşla birlikte gelişen telomer kısalma fenomeni hücrelerin büyüme potansiyellerini belirleyen kurulu bir saat gibidir. Telomerler kromozomların uçlarında yer alan; degradasyon ya da diğer kromozomlarla füzyonunu engelleyen yapılardır. Hücrenin her bölünmesinde telomer dizilerinin boyunda kısalma meydana gelir, her hücre için böylece bölünme yapabileceği sayı belirlenmiştir. Yaşla birlikte telomerlerin boyu özellikle lenfositlerde kısalırken, kök hücrelerde bir değişiklik olmamaktadır.<sup>32</sup>

#### 2.1.2.1.5. Hücre Ölümü Teorisi

Nekroz inflamatuvar olayların sorumlu olduğu hücre ölümüdür. Apoptoz ise genetik kontrollü hücre ölümüdür. Apoptoz homeostazın devamı açısından gerekli gelişimsel bir olaydır. Engellendiğinde, malign transformasyon artarken kontrolsüz olarak arttığında total fonksiyon kaybı gelişmektedir.<sup>33,34</sup>

#### 2.1.2.2. Dış Etkenler (Stotastik etkenler)

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

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

#### 2.1.2.2.1. Somatik Mutasyon ve DNA Tamiri Teorisi

Radyasyon gibi organ düzeyinde farklılaşma yaratan (glomeruloskleroz ve kanser gelişimi nedeniyle) dış etkenler, yaşlanma olmaksızın yaşam süresini kısaltır<sup>35</sup>. DNA tamiri teorisi ise hücre kültürlerinde ultraviyole ile yaratılan DNA hasarının tamir edilebilirliği oranında yaşam süresinin belirlendiği esasına dayanır. Ancak, yaşam süresinin belirlenmesinde ortalama tamir yeteneği ve tamir hızından çok “DNA'nın özel bölgelerinin tamir yeteneğinde” gelişen azalmanın daha önemli olduğu düşünülmektedir.<sup>36</sup>

#### 2.1.2.2.2. Ölümcül Hata Teorisi

Hücre fonksiyonlarında yaşa bağlı olarak meydana gelen değişikliklerin protein sentezindeki hataların birikmesinden kaynaklandığı esasına dayanır. Hatalı molekül sentezi normal protein üretimi esnasında da olur ve temizlenir.<sup>37</sup>

#### 2.1.2.2.3. Proteinlerin Değişikliğe Uğraması Teorisi

Proteinlerde meydana gelen fonksiyonel değişiklikler enzimlerde de gerçekleşir. Bu enzimlerin spesifik fonksiyonları azalırken, ısıya yanıtları da değişir (Proteinlerin ısı değişimlerine karşı toleransları azalır.)<sup>38</sup> Özellikle enzimatik olmayan yoldan gelişen; karbonhidrat ve

proteinlerin amino grupları ile etkileşimi “İleri Glukolizasyon Son Ürünleri” (AGE) ve amiloid birikimi ile sonuçlanır. Kollajen, elastin ve kristalin gibi hücre dışı matrix proteinlerinde meydana gelen değişiklikler ile kovalent çapraz bağların yapısının bozulması gen ekspresyonunun bozulmasına yol açar. Özellikle katarakt ve damar duvar sertleşmesinde bu mekanizmanın önemli rol oynadığı bilinmektedir.<sup>39</sup>

#### 2.1.2.2.4. Serbest Radikal Teorisi

İlk olarak “Harman” yaşlılığa bağlı değişikliklerin büyük çoğunluğunun elektron yükü bulunan molekül ve atomlardan kaynaklanan ve yüksek oranda reaktif olan serbest radikallere bağlı olduğu teorisini ortaya attı.<sup>40</sup> Bu teoride aslında hem dış etkenler hem de gelişimsel ve kalıtsal özellikler geçerlidir. Serbest radikal teorisi yaşlanmanın, yaşam süresince oluşan düşük düzeylerdeki serbest radikal hasarlarının birikmesi ile olduğunu öngörmektedir.<sup>41</sup> Serbest radikal teorisi, yaşlanmayı yaş ile birlikte dokuda artan peroksidatif hasar ve azalmış antioksidan kapasite olarak açıklar.<sup>42,43</sup> Oksidan, antioksidan dengenin; oksidan bölgenin lehine olması durumunda yaşlanmaya neden olabileceği düşünülmektedir. Reaktif oksijen metabolitleri gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, hücre çoğalmasında ve apoptotik hücre ölümünde de rol alırlar.<sup>44-46</sup>

## **2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar**

### 2.2.1. Serbest radikaller

Yapılarında eşleşmemiş elektron içeren atom veya bileşikler serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır<sup>1,2</sup>. Radikal ve serbest radikal terimleri sıklıkla birbirlerinin yerine kullanılmakla beraber, radikal terimi,

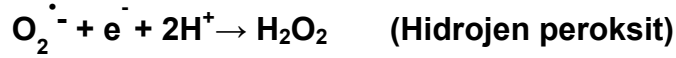
serbest radikalın su molekülleri tarafından tutulmuş bağlı formunu ifade etmek için kullanılmaktadır.<sup>47</sup>

#### 2.2.1.1 Serbest Radikallerin Oluşumu

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen metabolitleri (ROM) meydana gelmektedir. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında ROM oluşmakta ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biomoleküllere hasar vermektedir.<sup>3,4</sup> Aerobik metabolizma sonucunda superoksid radikaller ( $O_2^{\bullet-}$ ) gelişir. Bu radikaller superoksid dismutaz enzim tarafından hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve oksijene dönüştürülür.



Hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten ( $H_2O_2$ ) oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur.



“Fenton Kimyası” hipotezine göre  $OH^{\bullet}$  radikalleri DNA’ya saldırarak hasar oluşturur.  $O_2^{\bullet-}$  gibi  $H_2O_2$  de doğrudan DNA’da hasar yapmaz.  $OH^{\bullet}$  radikalının DNA üzerine etkili olabilmesi için DNA’da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. Reaktivitesi çok yüksek olan  $OH^{\bullet}$  radikalının hücre içinde diffüze olarak nükleusa geçme olasılıkları azdır. Olası mekanizma membranı kolayca geçebilen  $H_2O_2$ ’in nükleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyonlaşarak (Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları) hidroksil radikallerini oluşturmasıdır.

- $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$  (1)
- $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^{1+} \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Cu}^{2+}$  (2)
- $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{HO}_2^\bullet + \text{H}^+ + \text{Fe}^{2+}$  (3)
- $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\bullet -} \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{O}_2$  (4)

1 ve 2 numaralı reaksiyonlar demir/bakır katalizli Fenton reaksiyonları; 3 ve 4 numaralı reaksiyonlar ise Haber-Weiss reaksiyonları olarak adlandırılmaktadır.<sup>48</sup>

#### 2.2.1.2 Serbest Radikallerin Organizmadaki Etkileri

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ( $\text{L}^\bullet$ ) ve lipid peroksit radikallerinin ( $\text{LOO}^\bullet$ ) oluşması, reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipid radikali ( $\text{L}^\bullet$ ) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin ( $\text{L}^\bullet$ ) moleküler oksijenle ( $\text{O}_2$ ) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri ( $\text{LOO}^\bullet$ ) oluşur. Lipid peroksit radikalleri ( $\text{LOO}^\bullet$ ), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini

etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine (LOOH) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin (LOOH) yıkılımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten ( $H_2O_2$ ) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali ( $OH^\bullet$ ) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir.<sup>6</sup>

Membranın integral veya periferik proteinlerine ve DNA'ya çok yakın mesafede bulunan lipidlerden oluşan lipid alkoksil ( $LO^\bullet$ ) ve lipid peroksil ( $LOO^\bullet$ ) radikalleri, hücrenin kritik önem taşıyan moleküllerine  $OH^\bullet$  radikalinden daha etkin olarak hasar yapabilmektedir.  $OH^\bullet$  radikaline göre daha düşük reaktiviteye sahip oldukları için hücreler ve dokular arasında taşınabilecek kadar uzun yarı ömürlü olan lipid hidroperoksitler ve karbonil bileşikler, başlamış olan serbest radikal reaksiyonlarını ilerletme ve oksidatif stresi hücre, dokuda yaygınlaştırma potansiyeline sahiptirler. Ayrıca lipid radikalleri de singlet oksijen radikali ( $^1O_2$ ) gibi  $OH^\bullet$  radikallerinden daha özgün davranır ve tercihen guanin bazına etki eder. Oluşan başlıca lezyon tek dal kırıklarıdır. Lipid oksidasyonunun neden olduğu oksidatif DNA hasarında metaller kritik rol oynamaktadır. LOOH etkisi ile DNA'da tek dal kırığı oluşumunda  $Fe^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  iyonlarının katalitik etki yaptığı ve  $Fe^{2+}$ 'nin,  $Fe^{3+}$ 'den daha etkin olduğu öne sürülmüştür.<sup>49</sup>

Lipid peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ

asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehid (MDA) meydana gelir. Malondialdehid kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehid ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehytlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur.<sup>6</sup>

Stabil bir molekül olan DNA da; lipidler, karbohidratlar ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde  $10^3$  kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür. DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar, sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır. Yeni doğan sıçanlarda dahi oksidatif baz modifikasyonunun olduğu gösterilmiştir.<sup>5</sup> ROM oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır; Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir<sup>3,4</sup>. DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur.  $Fe^{2+/3+}$  ve  $Cu^{1+/2+}$  iyonları negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif transisyon metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü  $H_2O_2$ 'in hedefi haline getirmektedir.<sup>48</sup> Serbest radikal aracılı DNA hasarı **Şekil 1**'de gösterilmiştir.

Nükleaz aktivasyonu hipotezine göre oksidatif stres, sitozolik  $\text{Ca}^{2+}$  iyon konsantrasyonunda büyük bir artışa neden olarak nükleusdaki  $\text{Ca}^{2+}$  bağımlı endonukleazları aktive etmekte ve DNA'nın fragmantasyonuna neden olmaktadır. Nükleaz aktivasyonu DNA bazlarında kimyasal değişikliklere neden olmamaktadır.  $\text{Ca}^{2+}$  çelatörlerinin kullanımı ile DNA hasarının engellenebildiğini gösteren araştırmalar bulunmaktadır; Transisyon metal iyonlarının varlığı reaksiyon hızını, mekanizmasını ve baz modifikasyonunun türünü etkilemektedir. Ksantin oksidaz, hipoksantin ve ksantin gibi  $\text{O}_2^{\bullet-}$  radikali oluşturan sistemler ve aktive nötrofiller hücre membranından kolaylıkla diffüze olan  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluşumuna neden olarak hücrelerde yaygın DNA hasarı yapmaktadırlar.<sup>50</sup>

Mitokondriyal DNA (mtDNA) çift sarmal kapalı dairesel ve yaklaşık 16 kb ağırlığında çok kompakt yapıya sahip olan, elektron transport zincirinin (ETZ) 60 protein komponentinden 13'ünü, 22 tRNA ve 2 rRNA molekülünü kodlayan intronları ve kodlamayan büyük sekansları bulunmayan bir moleküldür.<sup>51,52</sup> mtDNA'nın ROM'ların başlıca oluşum yeri olan iç membrana yakınlıkları ve koruyucu histonlarının bulunmaması nedeni ile oksidasyon riski yüksektir. Protein ve lipidler kolay bir şekilde yıkılıp yeniden sentezlenebildikleri halde, DNA'daki oksidatif mutasyonlar kalıcı hale gelir.<sup>53</sup> Yaşlanma ile insan beyin mitokondri DNA'sında meydana gelen oksidatif hasarın nükleus DNA'sındaki hasara göre 10 kat daha fazla olduğu saptanmıştır<sup>11</sup>. ROM oluşumunun majör kaynağı olan mitokondriler aynı zamanda ROM'ların zararlı etkilerinin de önemli hedefidir. Mitokondriyal elektron transport zincirinden (ETZ) elektron kaçışı sonucu oluşan serbest radikaller önce mitokondride ve sonra hücrede hasar oluşturmaktadır.<sup>54</sup>

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin reaktif oksijen metabolitleri (ROM) üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) veya hidrojen peroksitle ( $H_2O_2$ ) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur.<sup>6</sup>

Proteinler yüksek glukoz konsantrasyonları ile karşılaştıklarında, glukoz bir enzimin aracılığına gereksinim duymadan proteine bağlanarak kontrolsüz glukozilasyon reaksiyonlarına neden olur. Glukozilasyona uğramış protein, moleküler oksijene bir elektron vererek serbest oksijen radikali oluşumuna neden olur<sup>55</sup>. Glukoz ve proteinlerin amino grupları arasında kendiliğinden gelişen enzimatik olmayan glukozilasyon reaksiyonları yoluyla önce Schiff bazları, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur. Amadori ürünlerinin oluşumundan sonra ileri glukozilasyon son ürünleri (AGE) meydana gelir.<sup>56</sup> AGE'ler, endotelin-1 aracılığıyla vazokonstriksiyonu arttırarak endotel hasarına yol açtığı gibi, kompleks biyokimyasal mekanizmalarla serbest radikal üretebilme kapasitesine de sahiptirler.

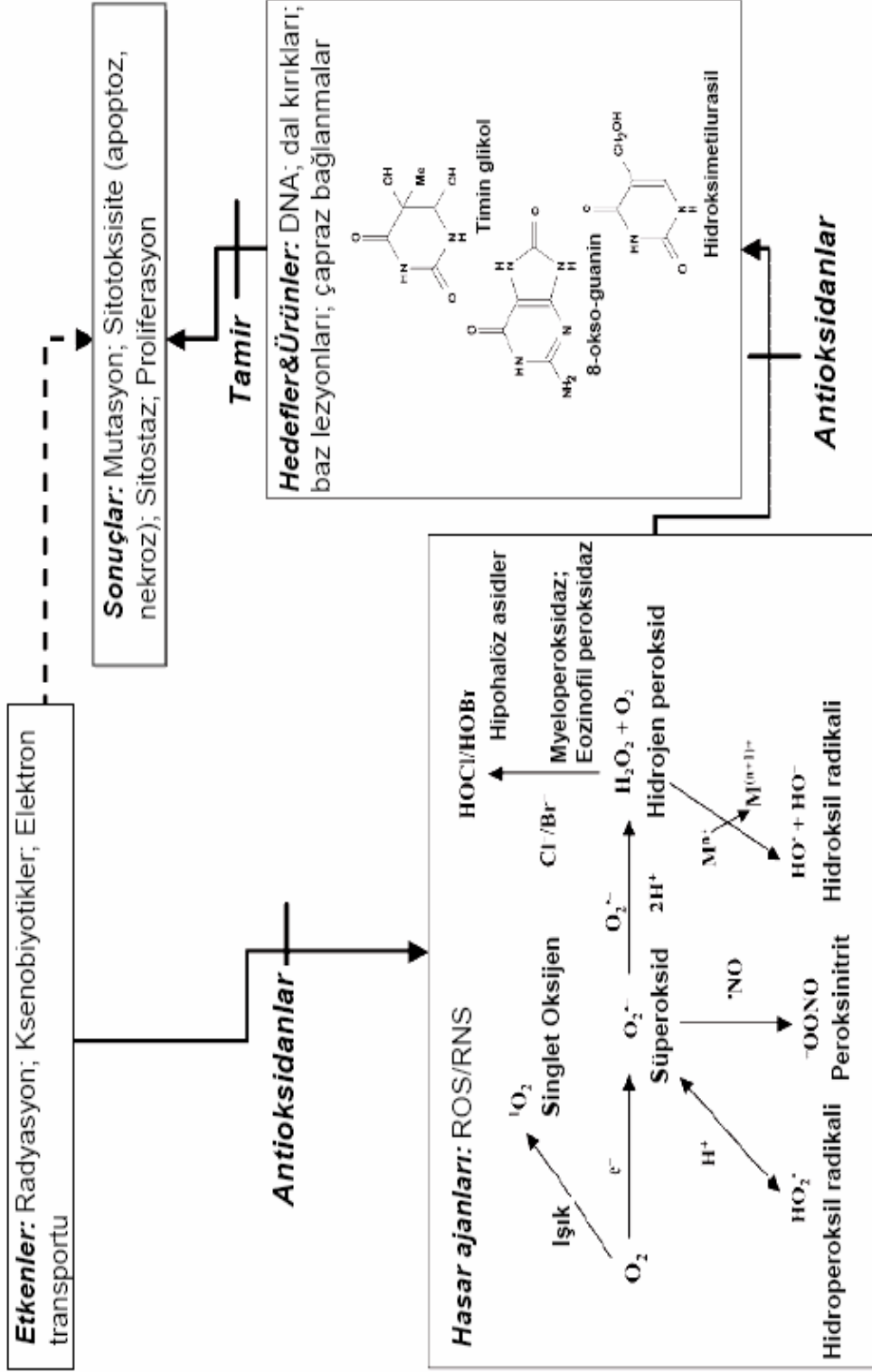
AGE'lerin toksik etkileri arasında; proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirebilmeleri, kendi reseptörleri ile oksidatif stresi indükleyebilmeleri ve sonuçta nükleer faktör kapa B (NFkB) gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive etmeleri ve ilgili genlerin (prokoagülant doku faktörü endotelin -1, adhezyon molekülü, VCAM-1 gibi) ekspresyonlarının artışı bulunmaktadır.<sup>57,58</sup>

#### 2.2.1.2.1 Oksidatif Stres ve Yaşlanma

Aerobik organizmalar yaşamları boyunca O<sub>2</sub> ile karşı karşıya kalır ve sürekli olarak prooksidan ve antioksidan sistemi dengede tutmaya çalışırlar. Yaşlanmada bu dengenin prooksidanlar lehine bozulduğu, yaş ile antioksidan kapasitenin azaldığı bilinmektedir<sup>42,43</sup>. Oksidatif stres pek çok hastalığın, iskemi reperfüzyon, Alzheimer, Parkinson, Diabetes mellitusun patogenezinde rol oynar; yaşayan canlılar için serbest radikallerinin yararlı ve zararlı etkileri çok hassas bir dengeyi oluşturur; bu denge redoks düzenleyicisi adı verilen sistem tarafından düzenlenir<sup>59</sup>. Redoks düzenleme sistemi oksidatif strese karşı canlıyı korur. Kanserde, diyabette, iskemi-reperfüzyon hasarında, ve yaşlanmada redoks dengesinin bozulduğu belirtilmiştir.<sup>60</sup>

Oksidatif stres ve yaşlanma arasında doğrudan ilişki vardır. Yapılan çalışmalarda genellikle yaşlanma ile birlikte dokulardaki serbest radikal düzeylerinin arttığı bildirilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda lipid peroksidasyon ürünlerinin yaşlı sıçanlarda hem mide ve hem de kan düzeylerinin gençlere oranla istatistiksel olarak anlamlı artışı bildirilmiştir.<sup>7,8</sup>. Yaşlanma ile birlikte görülen; nörodejeneratif hastalıklar, iskemi-reperfüzyon, sepsis gibi çeşitli patolojilerden reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) ve reaktif nitrojen metabolitlerinin (RNM) sorumlu olduğu bildirilmiştir.<sup>61-64</sup> Yaşlanma ile sıçanlarda kalpte<sup>9</sup> ve karaciğerde<sup>10</sup>;

insanda beyin<sup>11</sup>, diyafram kasında<sup>12</sup> serbest radikal düzeyinde artış ve oksidatif hasar bildirilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda; yaşlanma ile, insan ve sıçan serumunda<sup>65</sup> artmış oksidatif stres; insan granülosit hücrelerinde artmış süperoksit<sup>66</sup> üretimi ve sıçan hepatosit hücrelerinde artmış iNOS<sup>67</sup> aktivitesi bildirilmiştir; bununla beraber koroner endotel hücrelerinde eNOS<sup>68</sup> aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir. Yaşlanmaya karşı; her türün, bireyin, organın, dokunun hatta hücrenin bile farklı cevap verebileceği bildirilmiştir.<sup>69</sup>



Şekil 1. Serbest radikal aracılı oksidatif DNA hasarı<sup>70</sup>

### 2.2.1.3 Nitrik Oksit

Radikal hasarından sorumlu önemli bir molekülde nitrik oksittir. Küçük molekül ağırlıklı ve heterodiatomik moleküllu, zehirli bir gaz olan NO, daha önce endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak bildirilen maddenin NO olduğunun gösterilmesiyle bilimsel çalışmaların odağı haline geldi.<sup>47,71</sup> Lipid ve suda çözünen serbest radikal bir gaz olan NO, NO<sub>2</sub> gibi diğer radikaller, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> gibi orta derecede stabil anyonlar, NO<sub>3</sub> gibi dayanıklı anyonların yanında, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gibi dayanıksız oksitler ve ONOO<sup>-</sup> gibi dayanıksız peroksitler oluşturur. Düşük pH'da biriken NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrit) proton kazanarak nitroz aside ve daha sonra dismutasyonla NO'e dönüşür. NO tiollerle reaksiyona girerek "reaktif parçacıklı nitrik oksit" gibi depo formlar oluşturur. Bu depo formların bir elektron kaybetmesiyle sülfhidrifilik reaktanlar, nitrosoniyum (NO<sup>+</sup>) oluşur. Bu formların birçoğu biyolojik olarak bir kaç saniye gibi kısa bir sürede oluşmaktadır.<sup>72</sup>

Serbest bir radikal olan NO, nitrik oksit sentaz (NOS) denilen enzim ailesi tarafından, bir aminoasit olan L-arginin'in terminal guanidin grubunun NO'e çevrilmesiyle üretilir.

#### **L arginin → NO+L-sitrulin**

Bu oluşum esnasında moleküler oksijen ile, kofaktör olarak, nikotinamid adenin dinükleotid, (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve tetrahidrobiyopterin (BH<sub>4</sub>)'e ihtiyaç vardır. Bu şekilde üretilen ve işlevini yerine getiren NO, hızla hemoglobin, metilen mavisi ve süperoksit anyonu tarafından nötralize edilir veya 10 saniye içinde nitrat veya nitritlere dönüştürülür. NO<sup>•</sup> radikalinin stabil son ürünleri nitrit ve nitrattır. Plazma gibi çoğu vücut sıvısında nitritin çoğu nitrata dönüşmüştür.<sup>73,74</sup>

Nitrik oksit (NO) oluştuktan sonra: Methemoglobin ile nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) dönüştürölerek inaktive olur; süperoksit anyonları ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) ile birleşerek peroksinitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) dönüştür. Peroksinitrit, hidroksil radikalleri ( $\text{OH}^\cdot$ ) ve tirozinle (Tyr) birleşerek nitrotirozini oluşturlar.  $\text{OH}^\cdot$  ve  $\text{ONOO}^-$  radikal hasarına sebep olurlar.<sup>75</sup>

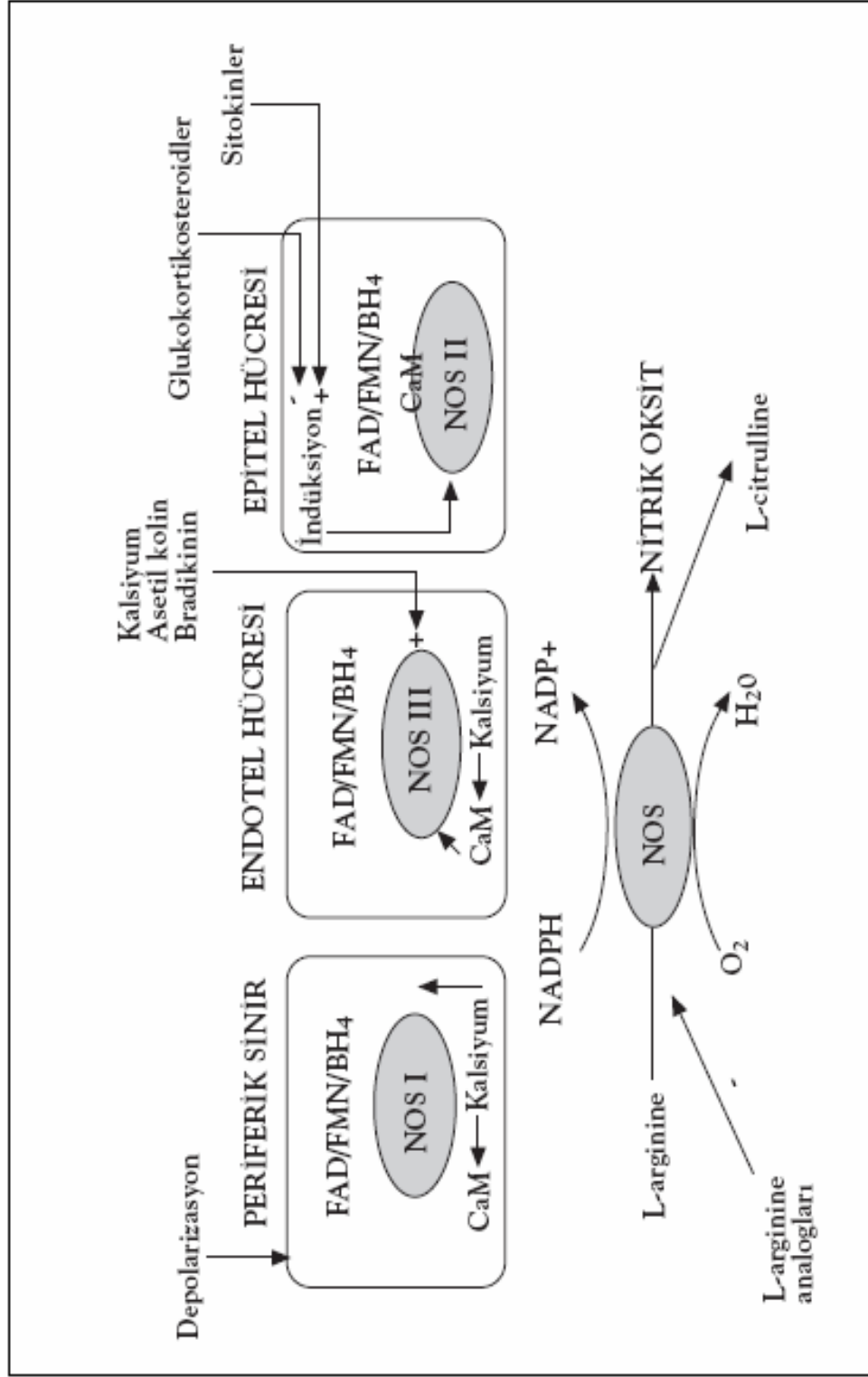
Nitrik oksit sentaz enzimleri (NOS), fizikokimyasal ve kinetik özelliklerine göre iki gruba (konstitutif ve indüklenabilir) ayrılır. NOS'ları sentezleyen 3 gen bulunur ve bu genlerden herbiri bir NOS izoformunu oluşturlur (NOS1, NOS2, NOS3).<sup>76,77</sup> Nöronal (nNOS) ve endotelyal (eNOS) olarak ta bilinen NOS1 ve NOS3, aktif hale gelmek için  $\text{Ca}^{++}$ 'a ihtiyaç duyar ve bu nedenle konstitutif NOS olarak adlandırılırlar. Nöronlardan ve endotelyal hücrelerden izole edilen konstitutif NOS'in sentez süresi kısa ve üretilen NO miktarı çok düşüktür. Bunun sebebi, hücre içi iyonize kalsiyum konsantrasyonu azalmaya başladığı anda enzimin inaktif duruma geçmesidir.<sup>78,79</sup> Endotoksin veya değişik sitokinlere cevap olarak makrofajlar ve diğer hücre tiplerinin uyarılmasıyla  $\text{Ca}^{++}$ 'dan bağımsız olarak salgılanan ve normal şartlarda gösterilemeyen NOS2'ye indüklenebilen veya uyarılabilen NOS (iNOS) adı verilir. Bu izoforma ayrıca immunolojik NOS de denilmektedir. Özellikle bakteri lipopolisakkaritleri ve interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) ile uyarılan makrofajlar bol miktarda NO üretirler. Bu şekilde iNOS'le üretilen NO sentezi saatlerce hatta günlerce devam edebilir.<sup>80,81</sup> (Nitrik oksitin oluşumu **Şekil 2**'de gösterilmiştir.) Düşük dozda özellikle nöronlarda ve damar düz kas hücre membranında bulunan guanilat siklazı aktive eden NO, damar dilatasyonu, sinirlerden uyarı geçişi gibi fonksiyonları gerçekleştirir<sup>75</sup>; düşük konsantrasyonunun aksine yüksek konsantrasyondaki NO, nörotoksik bir döngüyü başlatır.<sup>82,83</sup> Fokal iskemi'de, İnme'de, Alzheimer ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklarda, NO'in N-methyl-D-aspartate (NMDA) reseptörlerini etkileyerek ortaya çıkardığı aşırı miktarda glutamat'ın hücre ölümünde etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır. NMDA'nın aktivasyonu

muhtemelen intrasellüler kalsiyumda artışa neden olmakta, bu da glutamatın nörotoksisitesini başlatmaktadır.<sup>84</sup> NO, bu tip nörotoksisitenin dışında, merkezi sinir sisteminde oksijen nörotoksisitesi, AIDS demansındaki gibi başka tip nörotoksisitelere de kısmen aracılık edebilmektedir.<sup>82,85</sup> Ayrıca, NO'nın myelin kılıf üreten oligodendrositlere de direkt toksik etki yaparak, merkezi sinir sisteminin inflamatuvar olaylarında rol oynadığı bildirilmiştir. NO'nın bu etkilerine karşı NOS inhibitörlerinin koruyucu etki yaptığı gösterilmiştir.<sup>86</sup>

Reaktif nitrojen metabolitleri (RNM;  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{ONOOH}$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3^-$ ,  $\text{HNO}_2$ ) DNA bazlarının nitrolanmasına veya deaminasyonuna neden olmaktadır. RNM etkisi ile sitozinden urasil, guaninden ksantin ve adeninden hipoksantin oluşmaktadır.  $\text{ONOO}^-$  guaninden 8-nitroguanin ve hipoksantin oluşturabilir. 8-nitroguanin DNA yapısı içinde dayanıksız olduğundan spontan olarak depürinasyona uğrar ve abazik alanların oluşmasına neden olur.<sup>87</sup> Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ( $\text{NO}^\bullet$ ) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) ve nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit ( $\text{NO}_2^\bullet$ ), hidroksil radikali ( $\text{OH}^\bullet$ ), nitronyum iyonu ( $\text{NO}_2^+$ ), gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki nitrik oksitin ( $\text{NO}^\bullet$ ) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur.<sup>88</sup>

#### 2.2.1.3.1. Yaşlanma ve Nitrik Oksit

Yapılan araştırmalarda yaşlanma ile nitrik oksit düzeylerinde artış belirlenmiştir.<sup>89</sup> Serbest radikal olarak işlev gören nitrik oksitin merkezi sinir sisteminin yaşlanmasında etkili olduğu belirtilmiştir.<sup>90</sup> Yaşlanma ile birlikte artış gösteren peroksinitrit seviyesi öncelikli olarak mitokondriyal oksidatif hasara neden olur.<sup>91</sup> Yaşlanma ile paralel artış gösteren peroksinitrit; nitrozatif strese ve apoptoza neden olmaktadır.<sup>92</sup> Peroksinitrit nitratlayıcı ajan olarak etki eder, serbest veya proteine bağlı tirozin rezidülerini modifiye eder ve nitrotirozin oluşturur. Birçok akciğer hastalıklarında nitrotirozin düzeylerinin arttığı bulunmuştur. Astım, endotoksin şoku, akut respiratuvar distress sendromu, hiperoksi, sigara dumanının indüklediği pulmoner bozuklukları veya iskemi-reperfüzyon hasarını da içeren birçok akciğer bozukluklarının patofizyolojisi peroksinitrit oluşumunun artmasıyla ilişkili olabilir.<sup>93</sup> Yapılan çalışmalarda, genç ve yaşlı sıçanlarda yaşa bağlı olarak karaciğer<sup>94</sup>, ve beyin<sup>95</sup> NO düzeyinde artış saptanmıştır.



Şekil 2. Nitrik oksit (NO) kaynakları ve oluşumu<sup>75</sup>.

### 2.2.2. Antioksidanlar

Reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidanlar aktivitelerini dört ayrı şekilde gösterirler.<sup>49</sup> (Antioksidan moleküllerin başlıcaları **Tablo 1**'de gösterilmiştir.)

1. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip, onlara bir hidrojen aktararak; aktivitelerini azaltma ya da inaktif şekle dönüştürerek etki gösterir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
2. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları daha zayıf yeni moleküllere çevirerek etki gösterir. Antioksidan enzimler, bu tip etki gösterirler.
3. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincir kırıcı etki gösterirler. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller bu etkiye sahiptir.
4. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onararak etki gösterirler.

**Tablo 1. Antioksidan Çeşitleri**

| ANTIOKSIDANLAR                              |                                                |                                              |                                            |                                                   |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| ENDOJEN KAYNAKLI ANTIOKSIDANLAR             |                                                | EKZOJEN KAYNAKLI ANTIOKSIDANLAR              |                                            |                                                   |
| Enzim Yapısında Olan Endojen Antioksidanlar | Enzim Yapısında Olmayan Endojen Antioksidanlar | Vitamin Olan Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar | İlaç Olan Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar  | Gıdalarda Bulunan Ekzojen Kaynaklı Antioksidanlar |
| Süperoksit dismutaz                         | Melatonin                                      | $\alpha$ - tokoferol (vitamin E)             | Ksantin oksidaz inhibitörleri              | Butylated hydroxytoluene                          |
| Glutasyon peroksidaz                        | Glutasyon                                      | $\beta$ – karoten                            | NADPH oksidaz inhibitörleri                | Butylated hydroxyanisole                          |
| Glutasyon S-transferazlar                   | Seroplazmin                                    | Askorbik asit (vitamin C)                    | Rekombinant süperoksit dismutaz            | Sodyum benzoat                                    |
| Katalaz                                     | Transferin                                     | Folik asit (Folat)                           | Nonenzimatik serbest radikal topplayıcılar | Ethoxyquin                                        |
| Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi      | Miyogloblin                                    |                                              | Nötrofil adhezyon inhibitörleri            | Propylgalate                                      |
| Hidroperoksidazlar                          | Hemogloblin                                    |                                              |                                            | Fe- Süperoksit dismutaz                           |
|                                             | Ferritin                                       |                                              | Sitokinler                                 |                                                   |
|                                             | Bilüribin                                      |                                              |                                            |                                                   |
|                                             | Metiyonin                                      |                                              |                                            |                                                   |
|                                             | Laktoferrin                                    |                                              |                                            |                                                   |
|                                             | Albümin                                        |                                              |                                            |                                                   |

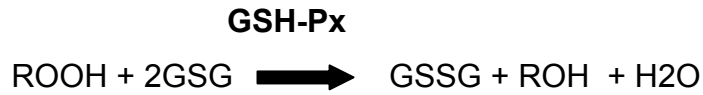
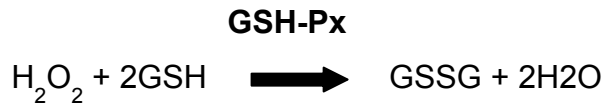
### 2.2.2.1 Glutasyon

Glutasyon hücreyi oksidatif strese karşı koruyan en önemli antioksidanlardandır.<sup>96-98</sup> Glutasyon (GSH) serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan taşınmasını da sağlar. GSH karaciğeri, eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir.<sup>99</sup>

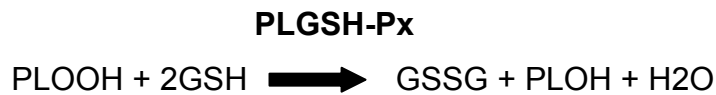
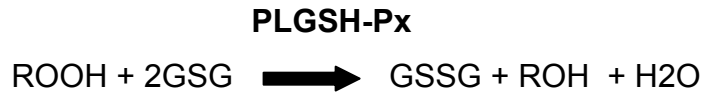
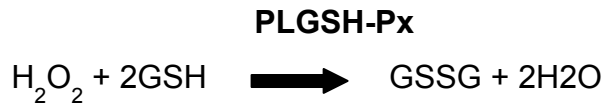
- Glutasyon; GSH-Px, GST gibi antioksidan enzimler için ko faktör olarak işlev görür.
- Hidroksil ve singlet oksijen radikalini direkt olarak temizler.
- Glutasyon peroksidazı aktive ederek; hidrojen peroksiti ve lipid peroksitleri temizleyici etkisini gösterir.
- Oksidan moleküller ile redoks dengesinin kurulmasında en önemli antioksidanlardandır.<sup>100</sup>

### 2.2.2.2 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) sitozolde bulunur, 4 selenyum atomu içerir, tetramerik yapıdadır. Glutasyon peroksidaz hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir.<sup>6</sup>



Bununla beraber; fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px) adı verilen bir enzim monomerik yapıdadır ve esas olarak membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger.



### 2.2.2.3 Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz, GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalize eder.



Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px) membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı korur. GSH-Px'ın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler<sup>6</sup>.

### 2.2.2.4 Glutasyon S Transferazlar

Glutasyon S-transferazlar (GST), her biri iki alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir. Glutasyon S-transferazlar (GST), başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar.



Glutasyon S-transferazlar (GST) katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Bunlar hem detoksifikasyon yaparlar

hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. GST'lar, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizlerler.<sup>6</sup>

#### 2.2.2.5. Antioksidanlar Ve Yaşlanma

Yaşlanma antioksidan enzim etkinliğinin azalması ile birliktedir. Antioksidan kapasitenin arttırılmasının yaşlanmayı geciktirici rol oynaması büyük bir ilgi alanı oluşturmuştur. Yapılan çalışmada; *Drosophila*' ya SOD uygulanması yaşam süresinin değişiminde etkili olmamıştır.<sup>101</sup> Sağlıklı insanlarda yapılan çalışmalar sonucunda; MDA, NO ve diğer radikal düzeylerinin yaşlanma ile birlikte artış gösterdiği ve buna karşın GSH düzeyinin ve antioksidan moleküllerin düzeylerinde azalış saptanmıştır.<sup>1,3,99</sup>

### **2.3. Melatonin**

#### 2.3.1. Melatonin Fizyolojisi

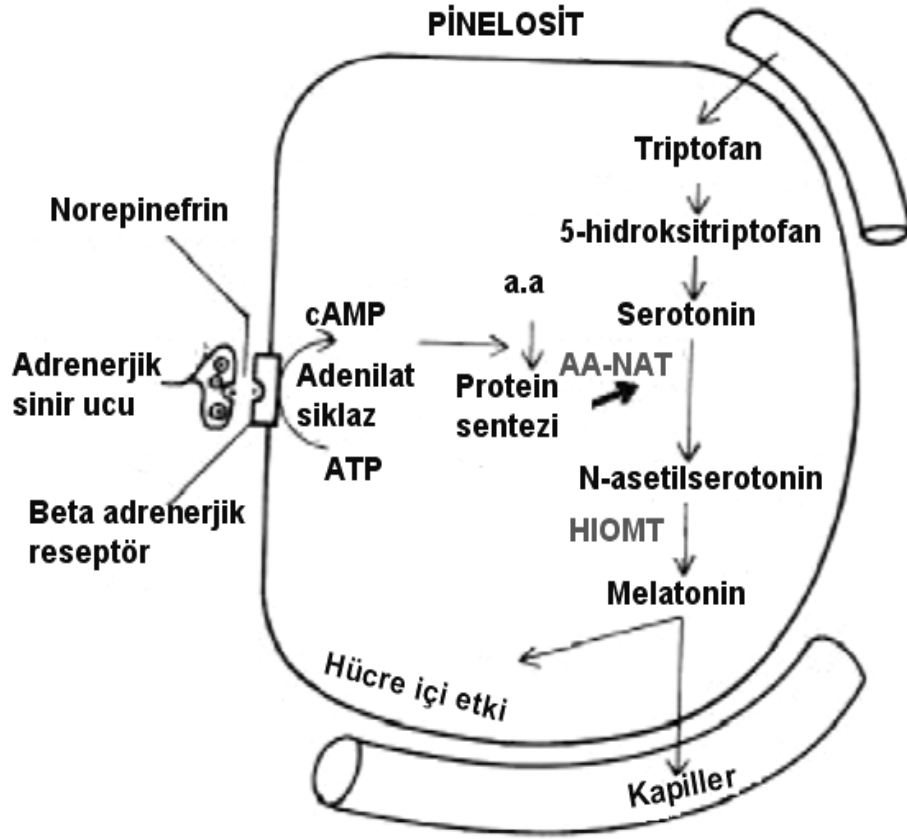
##### 2.3.1.1. Epifiz Bezi ve Melatonin

Melatonin (MEL), karanlıkta epifiz bezinden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur.<sup>13</sup>

### 2.3.1.2. Melatonin Sentez ve Metabolizması

Epifiz bezinin en önemli salgısı N asetil- 5-metoksitriptamin (Melatonin)'dir.<sup>102</sup> Melatonin epifiz bezinden başka, retina, barsak, pankreas gibi organlarda da sentezlenir.<sup>17,103</sup> Gastrointestinal sistemin; epifiz bezinden 400 kat daha fazla melatonin içerdiği gösterilmiştir.<sup>104</sup>

Epifiz bezi süperior servikal gangliondan sempatik uyarım alır. Epifiz bezinin sempatik sinir uçlarındaki en önemli nörotransmitter noradrenalin'dir. Noradrenalin, postsinaptik reseptörler olan pinealosit membranındaki  $\beta$  ve  $\alpha$  reseptörlerine bağlanır. Yaklaşık %85 melatonin  $\beta$  reseptörlerinin aktivasyonu ile, %15' i ise  $\alpha$  reseptörlerinin uyarılması ile sentez edilir,  $\beta$  ve  $\alpha$  adrenerjik reseptörlerin uyarılması ile hücre içinde cAMP ve N-asetiltransferaz (NAT) artışı olur: Melatoninin ön maddesi, bir aminoasid olan triptofandır ve bu, pinealositler içinde önce serotonine, daha sonra melatonine dönüşür. MEL sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan N-asetiltransferaz (NAT) aktivitesi, cAMP etkisiyle yükselmekte ve böylece sentezlenen ve salgılanan melatonin miktarı artmaktadır.<sup>105,106</sup> (**Şekil 3**)



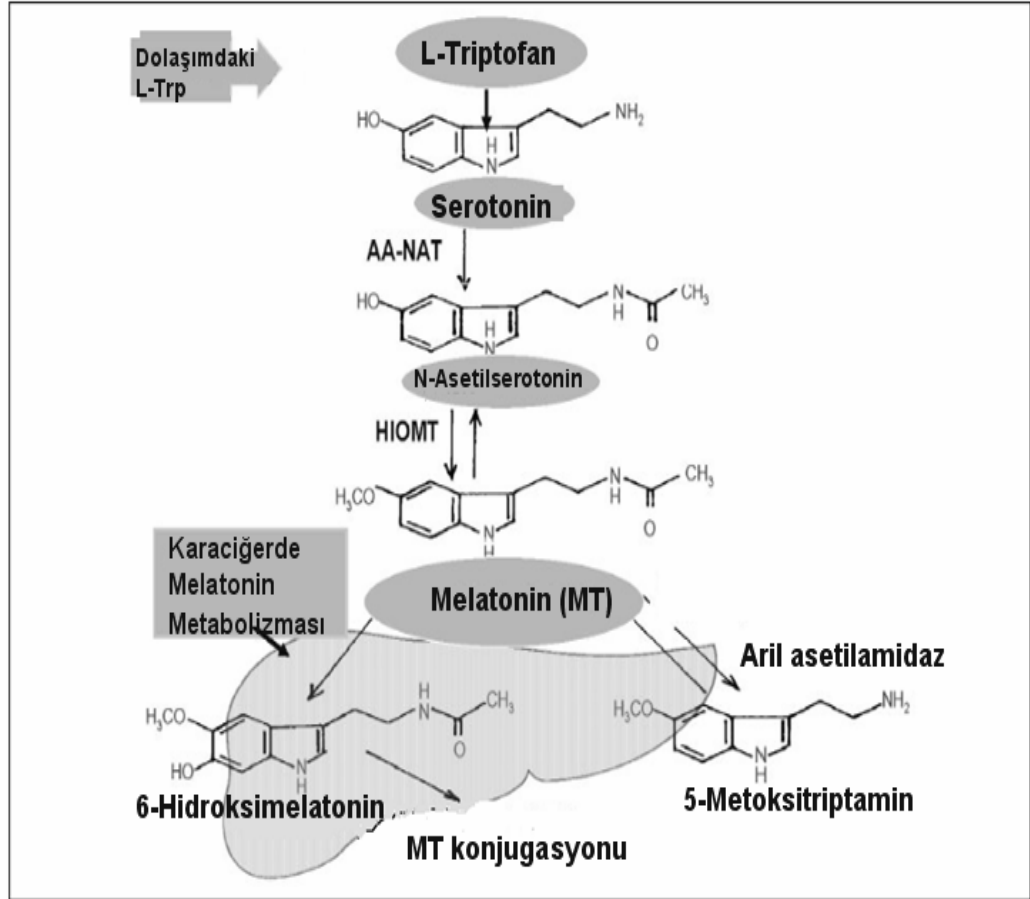
AAAD; Aromatik Aminoasit Dekarboksilaz

AA-NAT; Aril Alkilamin N-Asatıl transferaz

HIOMT; Hidroksiindol-O-metiltransferaz

Şekil 3. Pineosit hücrelerindeki melatonin sentezi.

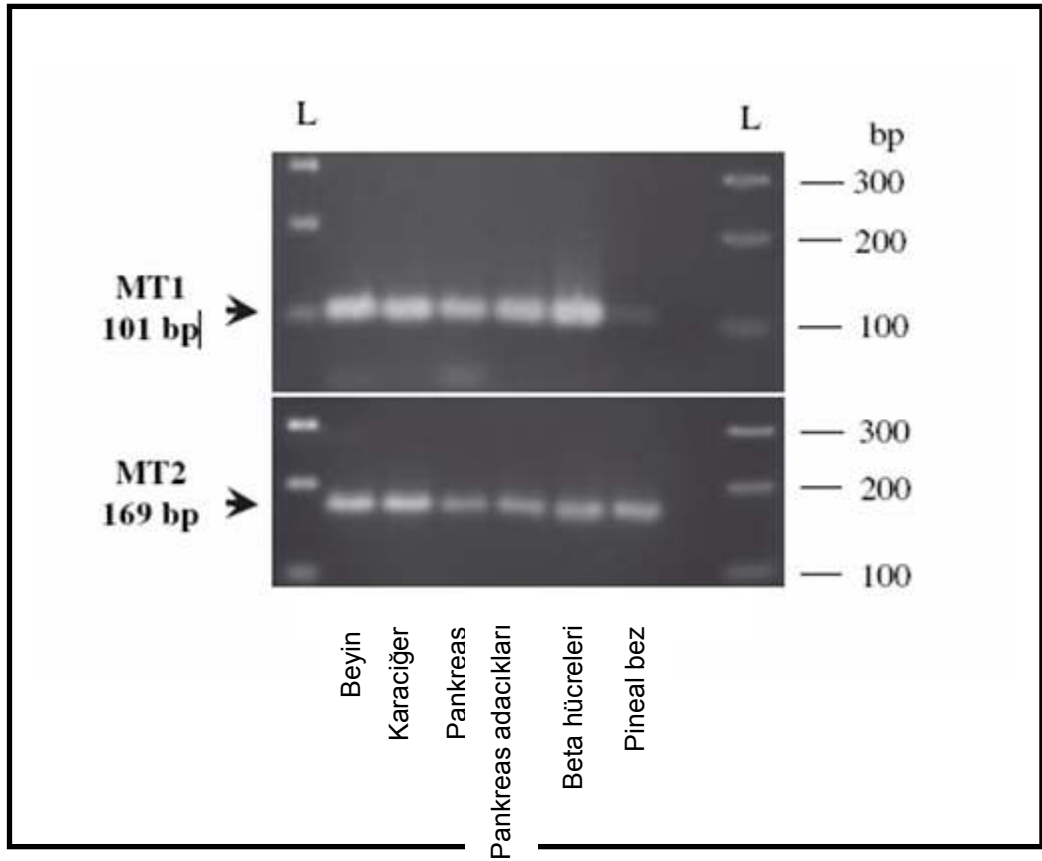
MEL sentezi sirkadien ritim gösterir. Aydınlıkta hiperpolarize olan retinal hücreler, karanlıkla beraber depolarize olarak, bezde MEL sentezini başlatırlar. Melatoninin salınımı geceleri büyük bir yükselme gösterir. Yükselmiş melatonin düzeyinin yüksek kalma süresi ise, karanlığın süresine bağlıdır. Kış aylarında, uzamış gecelerde, bu süre uzundur. Pinealektomi veya sempatik duyarsızlaştırma melatoninin gece yükselmesini önler. Melatonin üretildikten sonra hızlı bir biçimde önce kana, beyin omurilik sıvısı dahil olmak üzere tüm biyolojik sıvılara ve büyük olasılıkla da tüm dokulara dağılır.<sup>17,107</sup> Melatoninin plazma konsantrasyonu gündüz 0-20 pikogram/ml iken, gece 50-200 pikogram/ml düzeyine yükselmektedir.<sup>108</sup> Aydınlik dönemin uzaması veya aniden ışığa çıkılması melatonin üretimini durdurur.<sup>17,109</sup> Melatonin, karaciğerde melatonin hidroksilaz enzimi ile son metaboliti olan 6-hidroksimelatonine dönüştürülerek idrar yolu ile atılır; 6-hidroksimelatoninin idrardaki konsantrasyonu, serum melatonin konsantrasyonları ile paraleldir. Melatonin intravenöz olarak uygulandığında hızlı bir şekilde vücut kompartmanlarına dağılmakta ve serum yarılanma ömrü olan 30 saniye ile 5,6 dakika içerisinde elimine edilmektedir.<sup>110</sup> (**Şekil 4**).



**Şekil 4. Melatoninin biyosentezi ve metabolize edilmesi.**

### 2.3.1.3. Melatoninin Etki Yerleri

I-125 ile işaretlenmiş melatonin çalışmaları insan beyinde melatoninin başlıca birikim yerlerinin suprakiazmatik çekirdek ve pitüiter bezin pars-tüberalisi olduğunu göstermiştir. Melatonin reseptörleri pek çok organda gösterilmiştir (**Şekil 5**); bunlar MT1 ve MT2 dir. Melatoninin gece pikinden epifiz bezi sorumlu iken, gündüz pikinden barsak, pankreas gibi gastrointestinal sistem organları sorumludur.<sup>111</sup>



**Şekil 5. Çeşitli dokulardaki melatonin reseptörlerinin (MT1 ve MT2) jel elektroforezi sonucu görünüşü<sup>112</sup>.**

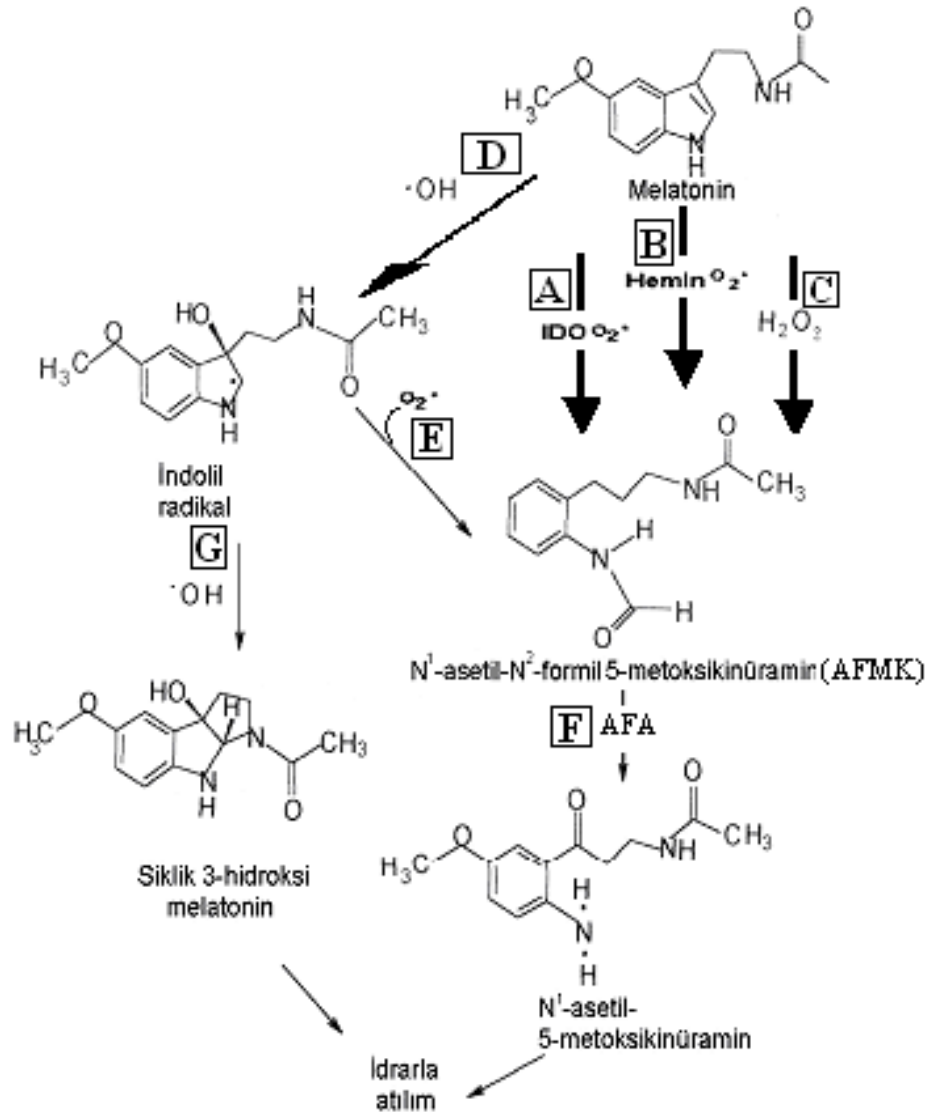
#### 2.3.1.4. Melatoninin Antioksidan Etkisi

Birçok biyolojik etkisinin yanı sıra, güçlü bir radikal süpürücü ve antioksidan özelliğe sahiptir. Bilinen tüm antioksidanlardan (mannitol, glutatyon, vit E, C gibi) daha güçlü serbest radikal süpürücü özelliği vardır<sup>14</sup>. Melatoninin antioksidan özelliği üç ana başlık altında toplanabilir;

1. Melatoninin Direkt Antioksidan Etkisi
2. Melatoninin Prooksidan Enzim Aracılı Etkisi
3. Melatoninin Antioksidan Enzim Aracılı Etkisi

##### 2.3.1.4.1. Melatoninin Direk Antioksidan Etkisi

Melatoninin  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HOCl}^\bullet$ ,  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{ONOO}^-$  gibi oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye ettiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebildiği bildirilmektedir<sup>18,19</sup>. Melatoninin antioksidan özelliği, yapısında bulunan pirol halkasından kaynaklanmaktadır. Fizyolojik şartlarda pek çok indol melatonine benzer şekilde yıkılsa da,  $\text{O}_2^\bullet$  varlığında, melatoninin pirol halkasının indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) ile enzimatik ya da hemin ile nonenzimatik olarak yıkımı, yüksek reaktiviteye sahip, N1-asetil-N2-formil-5- metoksikinüramin (AFMK) oluşumuyla sonuçlanmaktadır.<sup>113</sup> Bu metabolitin radikal tutucu aktivite gösterdiği belirlenmiştir<sup>19</sup> (**Şekil 6**). Askorbat,  $\alpha$ -tokoferol ve GSH gibi zincir reaksiyonlarını kırabilen diğer antioksidanlardan farklı olarak, melatonin yayılmakta olan lipid peroksidasyonunu peroksil radikalini yakalayarak sonlandırmaktadır.<sup>113</sup>



Şekil 6. Melatoninin antioksidan etkisi<sup>114</sup>.

#### 2.3.1.4.2. Melatoninin Prooksidan Enzim Aracılı Etkisi

Melatoninin bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir.<sup>18,19</sup> In vitro ve in vivo şartlarda, NO<sup>•</sup> ve daha ileri aşamada ONOO<sup>-</sup> oluşumuna neden olan nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinin, fizyolojik melatonin konsantrasyonlarında inhibe edildiği bildirilmektedir.<sup>115</sup> Beyin iskemi/reperfüzyon modelinde de, NOS inhibisyonuna yol açan melatoninin düzeltici etkilerinin olabileceği öne sürülmektedir.<sup>116</sup> Bunların dışında melatonin lipofilik özellik gösterdiği için, organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen melatonin tüm intraselüler komponentlere rahatlıkla ulaşabilir. Böylece melatonin, hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir<sup>17</sup>. Melatoninin antioksidan etkileri genel olarak incelendiğinde, adezyon moleküllerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin sentezini azaltmasını da içeren oldukça geniş spektruma sahip bir antioksidan olduğu görülebilir.<sup>117</sup>

#### 2.3.1.4.3. Melatoninin Antioksidan Enzim Aracılı Etkisi

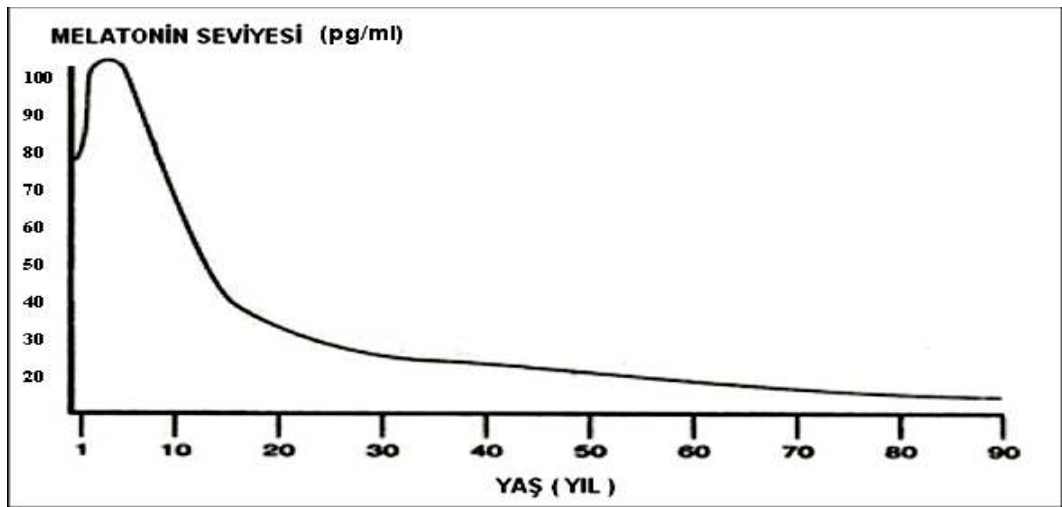
Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki melatoninin, SOD, GSH-Px, GSSG-Rd, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir.<sup>18,19</sup> Sıçanlara, akut/kronik uygulanan melatoninin beyin dokusu Mn-SOD ve CuZn-SOD sentezini artırdığı ve bu yolla oksidatif hasara karşı beyin dokusunu koruduğu gösterilmiştir<sup>118</sup>; bununla birlikte; anne sıçana verilen melatoninin plasentadan geçebildiği ve fetus beyinde SOD ve GSH aktivitesini artırdığı gösterilmiştir.<sup>119</sup>

Gündüze göre, gece feda edilen sıçanlarda beyin GSH-Px aktivitesinin daha yüksek bulunması, melatoninin biyolojik ritmine bağlanmaktadır. Hayvan modeli çalışmalarında, farmakolojik dozda uygulanan melatonin ile akciğer, barsak, böbrek, karaciğer, beyin, kalp, epifiz bezi ve eritrosit GSH-Px aktiviteleri, %22 ila %138 oranında artmaktadır. Sıçanlarda karaciğer, böbrek ve beyin dokusu GSH-Px aktivitesinin, melatonin uygulandıktan 3 saat sonra arttığı gözlenmiştir.<sup>120</sup> Nöral GSH-Px aktivitesinin, melatonine benzer şekilde, gündüz düşük; gece yüksek olduğu bulunmuştur.<sup>121</sup> Pinealektomi yapılan sıçanların karaciğer, akciğer ve beyin GSH-Px aktivitelerinde anlamlı düşüşler saptanmıştır.<sup>106</sup>

#### 2.3.1.5. Melatonin ve Yaşlanma

Yeni doğanda melatonin ritmi 3-4 aylık olana kadar görülmez ve melatonin düzeyi düşüktür. Bir yaşına kadar gelişir ve 1-3 yaş arasında en yüksek düzeyine ulaşır. Daha sonra yavaş yavaş düşer. İlerleyen yaşla birlikte melatonin ritmi bozulur ve epifizel melatonin üretimi de giderek azalır (**Şekil 7**). Yaşla beraber gece görülen melatonin piki %75 oranında azalır. Melatoninin ana üriner metaboliti olan 6-hidroksimelatonin de, yaşa bağımlı olarak azalır. Melatonin düzeyindeki düşmeye karşılık, melatonin üretiminde önemli bir enzim olan N-asetil transferaz aktivitesinde yaşa bağlı bir azalma görülmez, ancak epifiz bezinde hidroksiindol-O-metiltransferaz aktivitesinde azalma görülür<sup>122,123</sup>; bununla beraber pineal bezde ve serum NAT düzeyinde azalma bildirilmiştir.<sup>124</sup> Sıçanlar ile yapılan bir çalışmada; genç ve orta yaşlı deneklerin melatonin düzeylerine bakılmış ve yaşlanma ile birlikte melatonin düzeylerinde azalış belirtilmiştir.<sup>125</sup> Melatoninin ile yaşlanma ilişkisini araştıranlar; memelilerde yaş ile melatonin düzeyinin azaldığını bildirmişlerdir.<sup>126</sup>

Yaşlanmayla birlikte görülen epifiz bezindeki ve serum melatonin miktarındaki azalmanın en önemli etkenlerinden birisi pinealosit membranındaki  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin sayısının azalmasıdır. Yapılan çalışmalar bu reseptörlerin yoğunluğunda azalmanın olduğunu göstermesine karşın reseptörlere bağlanan ajanların bu reseptörlere olan afinitelerinde bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Bu çalışmaların sonucu yaşlanmayla giderek azalan melatonin ritminin  $\beta$ -adrenerjik reseptör yoğunluğundaki azalmayla aynı anda olduğunu göstermektedir. Yaşlanmayla birlikte epifiz bezinin üretiminin azalmasının ikinci önemli nedeni ise suprakiazmatik çekirdekte azalan hücre sayısıdır.<sup>15,16</sup> Pinealektomi sonrası melatonin'in ritmik pik seviyeleri bozulmaktadır.<sup>127</sup> Pinealektomi yapılmış sıçanlarda yapılan bir çalışmada, artan oksidatif hasar, dolaşımdaki azalmış melatonine bağlanmıştır.<sup>128</sup> Kanseri, katarakt gibi yaşlanma ile artış gösteren hastalıklarda; melatonin uygulanmasının hasarı düzeltici etki gösterdiği bildirilmiştir.<sup>129,130</sup> Yapılan bir çalışmada 2 ile 22 aylık sıçanlar karşılaştırıldığında; yaşlanma ile karaciğerde NO artışı ile lipid peroksidasyonunun artışı bildirilmiştir. Melatonin veya büyüme hormonu (GH) uygulanmasının bu artışı azalttığı gösterilmiştir.<sup>94</sup>



Şekil 7 Yaşlanma etkisi ile melatonin sentezinin azalması<sup>131</sup>.

## 2.4. Pankreas

### 2.4.1. Pankreas Fizyolojisi

Pankreas hem ekzokrin, hem de endokrin salgı yapan bir bezdir. Organın endokrin sekresyonu (insülin, glukagon, somatostatin ve pankreatik polipeptit'dir) yaşamın devam etmesi için gerekli olup Langerhans adacıklarından salgılanır. Adacıklar morfoloji ve boyanma özellikleriyle birbirinden ayrılan dört tip hücreden oluşur.

- BETA hücreleri: Adacıkların % 60-80' ini oluşturur ve insülin salgırlar.
- ALFA hücreleri: Adacıkların %10-20' sini oluşturur ve glukagon salgırlar.
- DELTA hücreleri: Adacıkların yaklaşık %10' unu oluşturur ve somatostatin salgırlar.
- F hücreleri ; Adacıkların yaklaşık % 2' sini oluşturur ve pankreatik polipeptid salgırlar.

Pankreasın temel ekzokrin salgı ünitesi asinüstür ve günde ortalama 1500-2000 ml berrak, izotonik ve alkali (pH: 8.0- 8.3) ekzokrin salgısı vardır. Bu salgı 20'den çok sindirim enzimini içinde bulundurur. Pankreas ekzokrin salgısı temel üç besin maddesinin sindirimini sağlayan enzimleri içerir: bu enzimler protein, karbonhidrat ve yağların sindirimini sağlar.<sup>20,132</sup>

#### 2.4.2. Yaşlanma ve Pankreas

Pankreasın endokrin ve ekzokrin işlevleri yaş ilerledikçe azalır ve parenkimde yağ infiltrasyonu gözlenir.<sup>21,24</sup> Klinik semptomların görülmesi için pankreasın ekzokrin salgı yapan bölümlerinin % 90'ının hasar göstermesi gerekmektedir.<sup>133</sup> İnsan pankreasının ağırlığının yaşlanma ile birlikte azalış gösterdiği bildirilmiştir.<sup>134</sup> Yaşlanma ile birlikte pankreas dokusundaki histolojik değişimler genelde; duktal epitelyum hiperplazisi ve lobular fibrozistir; bununla birlikte ana pankreatik kanal dilate olarak 10 mm'ye ulaşabilir.<sup>135</sup> Yaşlanma ile birlikte pankreas parankiminde lipoatrofi, lipofuscin depolanması görülebilir.<sup>136</sup> Yapılan farklı çalışmalarda; yaşlanma ile birlikte pankreasta bikarbonat sekresyonunda ve pankreatik sıvıdaki lipaz konsantrasyonunda azalış bildirilmiştir; aynı zamanda sekretin veya CCK'nın pankreas stimule edici etkisinde azalış gözlemlenmiştir.<sup>137</sup> Beta hücresi yaşın ilerlemesi ile birlikte daha çok granül içerir, yaşlanan bir sıçanda pankreas adacıkları daha çok insülin depolar, ancak yaşlanma ile Langerhans adacıklarındaki glukoz duyarlılığı azalır, bununla birlikte daha az verimle insülin salgılanır.<sup>129,138</sup>

Yaşlanmaya bağlı olarak karbonhidrat ve insülin metabolizmasında ki değişiklikler aşağıda belirtilmiştir (**Tablo 2**); bu değişiklikler yaşlanmaya bağlı glukoz duyarlılığındaki değişikliğin başlıca nedenleridir.<sup>139</sup>

**Tablo 2. Yaşlanmaya bağlı olarak karbonhidrat ve insülin metabolizmasında ki değişiklikler**

### **İNSÜLİN METABOLİZMASINDAKİ DEĞİŞİMLER:**

- Değişmeyen veya Yükselmiş Plazma İnsülin Seviyesi
- İnsülin Reseptörlerindeki Değişme ve Hedef Dokunun Internalizasyonu
- Hedef Dokulardaki Glukoz Taşıyıcılarının Azalması
- Postreseptör Değişimlerinide İçeren Hücresel Enzimlerin Aktivitelerindeki Değişimler
- Proinsülin Sekresyonundaki Artış (insüline dönüşecek)

### **KARBONHİDRAT METABOLİZMASINDAKİ DEĞİŞİKLİKLER:**

- Vücut Kas Kütlesinde Azalış ve Adiposit Dokuda Artış
- Fiziksel Aktivite Azalışı
- Plazma Serbest Yağ Asitlerindeki Artışına Bağlı Hücre Glukoz Oksidasyonunda ki İnhibisyon
- Karaciğerdeki Glukoneogenezin Artışı

### 2.4.3. Oksidatif Stres ve Pankreas

Antioksidan kapasite; pankreas adacık hücrelerinde diğer dokulara (karaciğer, böbrek, iskelet kası, vb) göre düşük bulunmaktadır<sup>22</sup>. Oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olduğu da bilinen beta hücrelerinde gözlenen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.<sup>140</sup> Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında yakın ilişki olduğu görüşü in vivo çalışmalar ile de desteklenmiştir<sup>141</sup>. Serbest radikal oluşumunun hipergliseminin direkt sonucu olduğunu destekleyen çalışmaların yanı sıra endotel ve düz kas hücreleri yüksek konsantrasyonda glukoz içeren ortamda inkübe edildiğinde de serbest radikal oluşumunun başladığı gözlenmiştir.<sup>142-144</sup>

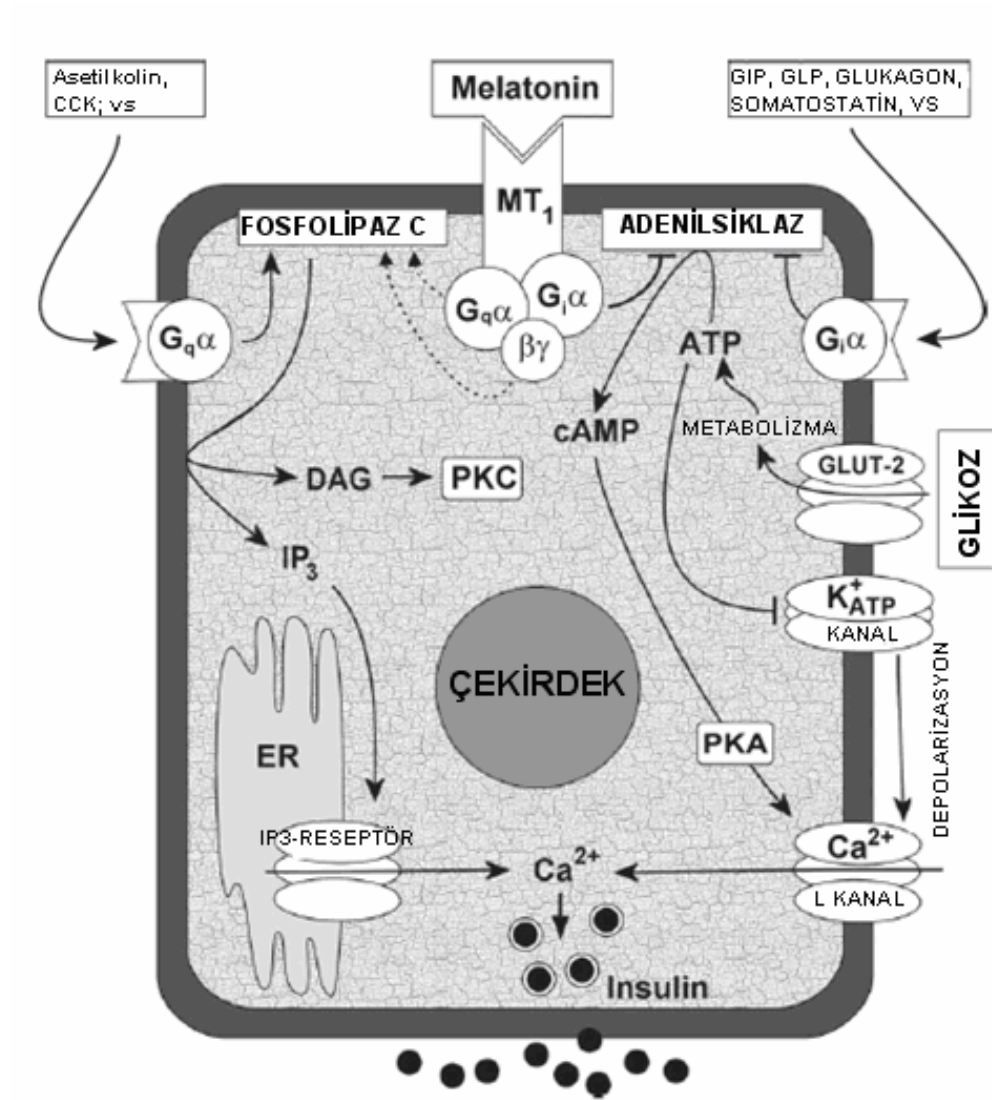
Deneyssel olarak diabet modelinde kullanılan alloksan ve streptozin gibi maddelerin özelliklerinden biri de aşırı miktarda ROM oluşturmasıdır. ROM üretiminin artması ve hücrelerde birikmesi beta hücre harabiyetine neden olur, çünkü beta hücreleri oksidatif strese karşı çok hassastır ve düşük antioksidan kapasiteye sahiptir. Yapılan çalışmalarda radikal hasarı sonucunda oluşan beta hücre harabiyetine bağlı diabetin patogeneğinde nitrik oksitin de sorumlu olduğu gösterilmiştir.<sup>145</sup> Hidroksil radikalının insülin reseptör sinyal sistemi üzerinden etkili olduğu gösteren çalışmalar vardır. Glukozilasyon aracılı serbest radikal üretiminin insülinin gen transkripsiyonunu azalttığını ve beta hücre apoptozuna yol açtığını gösteren çalışmalar bu görüşü desteklemektedir.<sup>146</sup>

Akut pankreatit aktif hale geçmiş polimorfik lökositlerden salınan oksidan moleküllere bağlı oluşan önemli bir hastalıktır. Akut pankreatit sırasında pankreasın kan dolaşımında yoğun bir azalış göze çarpar; melatonin uygulanması ile bu dolaşım sorununun düzeldiği ve doku oksijenasyonunun normale döndüğü belirtilmiştir.<sup>21,24</sup> T ve B

lenfositlerin, makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerin beta hücrelerine toksik etkilerini de serbest radikaller aracılığıyla yaptığı düşünülmektedir.<sup>147</sup> Diabet ve diabet komplikasyonlarının reaktif oksijen metabolitleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, nonenzimatik glukozilasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır.<sup>148-151</sup> Diabet oluşturulan sıçan deney modellerinde oksidatif stres belirteci olarak değerlendirilen 8-OHdG (8-hidroksi deoksiguanozin) düzeylerinde de artış gözlenmiştir.<sup>152</sup> Deneysel hayvan çalışmalarında insanlardakine benzer diabet oluşturmak için kullanılan N- nitroso türevi D glukozamin yapısındaki streptozin; oksidan moleküller oluşturarak Langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip etmekte; diyabeti ve pankreas hasarını başlattığı düşünülmektedir.<sup>153-155</sup> Yapılan çalışmalarda; 65 yaşın üzerindeki bireylerde pankreas kanseri görülme olasılığı 20 kat artış göstermektedir.<sup>156</sup>

#### 2.4.4. Melatonin ve İnsülin Sekresyonu

Melatonin ve insülin sekresyonu konusunda literatürdeki çalışmalar birbiriyle çelişmektedir. Melatonin pankreas dokusunda da yer alan MT1 reseptörü ile birleşerek; hücre içi adenilsiklaz aktivitesini ve insülin sekresyonu azaltır (**Şekil 8**); ancak melatonin IP<sub>3</sub> yolağı ve hücre içi kalsiyum düzeyi üzerinden insülin sekresyonunu arttırdığı da bildirilmiştir.<sup>157</sup>



Şekil 8 Melatoninin insülin sekresyonu üzerindeki etkisi

#### 2.4.5. Pankreas ve Melatonin

Melatonin güçlü bir antioksidan olarak pankreasta da etki gösterir, bunun yanı sıra pankreasta Langerhans adacıklarında yer alan beta hücreleri üzerinde hem in vivo hem in vitro şartlarda insülin salgısını etkiler. Bu etkisini; pankreasta da bulunan MT1 ve MT2 reseptörleri üzerinden gösterir. Melatonin cAMP sentezini engelleyerek insülin sekresyonunu azaltıcı yönde etki yapar.(**Şekil 8**)  $IP_3$  üzerinden çalışan bir diğer sistem de; insülin salgısını günlük bir ritim şeklinde düzenlemeye yardımcıdır. Adacıklar içinde oluşturulan bu ritim melatonin tarafından etkilenir. Gece yükselen melatonin miktarı ile orantılı olarak artan glukoz düzeyi; melatoninin insülin sekresyonu üzerindeki inhibitörük etkisine bağlanmıştır.<sup>157</sup>

Farmakolojik dozlarda ekzojen olarak melatonin uygulanmasının oksidatif strese karşı pankreası koruyabileceği belirtilmiştir. Melatonin güçlü bir radikal süpürücü olarak streptozinin neden olduğu diabetin yanısıra alloksana karşı da pankreası koruyucu etki gösterir<sup>22,25</sup>. Caerulein ile oluşturulan deneysel pankreatitte; melatonin uygulanması yükselmiş MDA düzeyini azaltarak; pankreası oksidatif hasara karşı korumuştur<sup>23</sup>. Casares ve arkadaşlarının çalışmasında; iskemi-reperfüzyonun neden olduğu oksidatif stres, pankreasta artmış LPO, azalmış enzimatik (CAT, SOD, GSH-Px) ve nonenzimatik (GSH) antioksidanlar ile birlikte dir. Melatonin tedavisi antioksidan etkisi ile serbest radikal ürünleri olan malondialdehidi (MDA) ve 4-hidroksinonenalı (4HNE) azaltmış; GSH, SOD, CAT, GSH-Px gibi antioksidan dengeyi düzenlemiştir. Melatoninin iskemi-reperfüzyon uygulanmasından önce verilmesi koruyucu etkisini arttırmıştır.<sup>158</sup>

Yaşlanma sonucunda pankreasın ekzokrin sekresyonu azalış gösterir, melatonin uygulandıktan sonra pankreatik amilaz sekresyonunda göze çarpar bir yükseliş olduğu belirtilmiştir. Melatonin uygulaması doz bağımlı olarak pankreas sekresyonunu artırır.<sup>159,160</sup> İskemi – reperfüzyon etkisi ile oluşturulan akut pankreatit öncesinde melatonin uygulanması ile pankreas hasarı azaltılmıştır. Melatoninin akut inflamasyonu ve lipid peroksidasyonunu azaltarak bu etkiyi sağladığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra melatoninin antiinflamatuvar etki gösteren interleukin 10 (IL 10) miktarını arttırdığı ve proinflamatuvar etki gösteren tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ) azalttığı belirtilmiştir<sup>24</sup>. Melatoninin asiner hücrelerinde ısı şok proteinlerinin gen ekspresyonunu arttırdığı belirtilmiştir, ısı şok proteinleri hücre bölümlerini hasara karşı koruyucu etki gösterir ve yüksek sıcaklığa, oksidatif strese veya inflamasyona karşı aktive olarak hücreyi koruyucu etkisini gösterir<sup>161</sup>. Juan ve arkadaşlarının hamsterlar ile yaptıkları çalışmada; N-nitrosobis (2-oxopropyl) amine (BOP) kullanılarak deneysel olarak pankreas kanseri oluşturulmuştur; melatonin uygulanması pankreası koruyucu etki göstermiştir. (LPO seviyesinde azalma; SOD, GSH, GSH-Px, CAT seviyesinde artış bildirilmiştir.)<sup>162</sup>

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Araştırma Planı

Çalışmamızda erkek, 4 aylık genç ve 14 aylık orta yaşlı Wistar sıçanlar kullanıldı. Çalışma grubunu oluşturan tüm sıçanlar laboratuvar ortamında, 12 saat aydınlıkta ve 12 saat karanlıkta olacak şekilde normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile beslendi.<sup>99,163</sup> Sıçanlar **Tablo 3** de gösterildiği şekilde 4 gruba ayrıldı.

**Tablo 3 Çalışma grupları ve özellikleri**

| Gruplar                         | Uygulama              | Denek Sayısı | Başlangıç ağırlığı (gr) |
|---------------------------------|-----------------------|--------------|-------------------------|
| 1. grup<br>(genç-deney)         | PBS+etanol +melatonin | 8            | 164±6.0 g               |
| 2. grup<br>(genç-kontrol)       | PBS+etanol            | 8            | 167±6.0 g               |
| 3. grup<br>(orta yaşlı deney)   | PBS+etanol +melatonin | 10           | 330±10.0g               |
| 4. grup<br>(orta yaşlı kontrol) | PBS+etanol            | 10           | 330±9.0g                |

Deney grubundaki sıçanlara 10 mg/kg/gün melatonin [% 1 lik etanol-pbs çözeltisinde, 0,2 cc] toplam 7 gün süreyle s.c. (saat 18:00) uygulandı. Kontrol grubundaki sıçanlara ise 7 gün süreyle 0,2 cc %1 lik etanol-pbs (**pbse**) s.c. (saat 18:00) uygulandı. Çalışma grubunu oluşturan tüm sıçanlar laboratuvar ortamında, 12 saat aydınlıkta ve 12 saat karanlıkta olacak şekilde normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile beslendi. Bu düzen otomatik olarak çalışan bir zaman saati ile sağlandı. Bir haftanın sonunda sıçanların kalbinden kan alınıp takiben dekapite edilerek pankreas örnekleri alındı. Alınan pankreas dokusu azot tankında derhal dondurularak çalışılmak üzere  $-86^{\circ}\text{C}$  de derin dondurucuda saklandı. Alınan örneklerde aşağıdaki parametreler çalışıldı.

Radikal hasarının göstergesi olarak kabul edilebilecek ve lipid peroksidasyonu ile paralel değişim gösteren pankreas MDA düzeyi tiobarbitürik asit reaktif (TBARS) madde oluşumu yöntemi ile çalışıldı.<sup>164</sup> Radikal hasarına neden olabilecek pankreas NOx düzeyi Griess Yöntemi ile çalışıldı.<sup>165</sup> Antioksidan kapasitenin göstergesi olarak kabul edilen; pankreas glutatyon (GSH) tayini modifiye Ellman yöntemi ile çalışıldı.<sup>166</sup>

### 3.2. Kullanılan Gereçler, Maddeler ve Denekler

- Santrifüj: MPW-350 (soğutma sistemli)
- Homojenizatör: HEIDOLPH - DIAx 900
- Spektrofotometre: BIOKIT EL x 800 Bioelisa Reader
- Tartı: SARTORIUS Basic
- İstatistik Programı: SPSS for Windows 10.0

Araştırmada kullanılan Melatonin; MDA, GSH ve NOx tayinlerinde kullanılan kimyasal maddeler Sigma Chemical Company, deney hayvanları Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

### 3.3. Tayin Yöntemleri

#### 3.3.1. Dokuda TBARS Tayin Yöntemi

Pankreas dokusunda lipid peroksidasyon derecesi tiobarbütirik asit reaktif madde oluşumu yöntemi ile çalışıldı<sup>7</sup>. Doku örnekleri homojenizatör ile soğuk TCA (1 g doku + 9 ml % 10'luk TCA) içinde buzlu ortamda homojenize edildi. Daha sonra 15 dakika süreyle 4000 rpm de santrifüj edildi ve süpernatant alınarak 4000 rpm de 8 dakika tekrar santrifüj edildi. Örnekten 750 mikrolitre alınarak üzerine 750 mikrolitre % 0.67'lik TBA eklendi. Daha sonra örnekler 100 °C de

kaynayan su banyosunda 15 dakika bekletildi, ve daha sonra soğutularak 4000 rpm de santrifüj edildi. Süpernatant alınarak her bir örneğin absorbansı 532 nm de tayin edildi. Pankreas lipid peroksidasyon düzeyi  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  katsayısı kullanılarak MDA eşdeğeri olarak ifade edildi.

### 3.3.2. Dokuda Glutasyon Tayin Yöntemi

Pankreas dokusunda glutasyon (GSH) tayini için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı<sup>7</sup>. Lipid peroksidasyonunda anlatıldığı şekilde pankreas dokuları homojenize edilip santrifüj edildikten sonra , 2 hacim supernatan, 8 hacim 0.3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve 1 hacim ditiyobisnitrobenzoat (0.4 mg/ml % 1'lik sodyum sitrat) çözeltisi ile karıştırıldı. Daha sonra spektrofotometrede karışımın 412 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü ve glutasyon düzeyleri  $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  katsayısı kullanılarak hesaplandı.

### 3.3.3. Dokuda Nitrik Oksit Tayin Yöntemi

Pankreas dokusunda NOx miktarı Griess metodu ile çalışıldı.<sup>165</sup> 0,3 gram doku alınır, beş katı hacimde PBS eklenerek homojenize edilir (PBS Çözeltisi İçin; 8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 0,92 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 litre suda çözülür, pH= 7,4 olacak şekilde ayarlanır). 2000 RCF de +4 °C'da 5 dakika santrifüj edilir, Üzerine 250 mikrolitre 0,3 N NaOH ilave edilir, Oda ısısında beş dakika inkübasyona bırakılır, 250 mikrolitre % 10'luk  $\text{ZnSO}_4$  ilave edilir, Vortekslenir, 3000 RCF de +4 °C'da 20 dakika santrifüj edilir, Süpernatanın 500 mikrolitresi 14000 rpm de +4 °C'da 5 dakika santrifüj edilir.

NO<sub>x</sub> miktarını belirlemek için, 1 birim süpernatant, 1 birim V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (400 mg V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> tartılır, 1 molar HCl çözeltisi ile 50 ml'ye tamamlanarak karıştırılır.), 0,5 birim sülfanamid (2 gram Sülfanamid tartılır, 100 ml olacak şekilde % 5 lik HCl çözeltisinde çözülür) 0,5 birim NEED karışımı (100 mg N-(1-Naphthyl) Ethyl-Ethanediamine tartılır, 100 ml olacak şekilde deiyonize su içerisinde çözülür.), 37 °C'da 30 dakika inkübe edilir, hazırlanan karışım spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okunur. NO<sub>x</sub> miktarı hazırlanan standart çözeltiye göre hesaplanır.

#### 3.3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi; "SPSS for Windows 10.0" paket programı kullanılarak "Mann-Whitney U" testi ile yapıldı. P < 0,05 anlamlı fark olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Çalışmamızda sıçanlardan alınan pankreas dokusunda oksidan stresin göstergesi olarak MDA ve NOx düzeyleri ile antioksidan olarak fonksiyon gören GSH düzeyi ölçüldü. Bulgular **Tablo 4**'de; **Şekil 9**, **Şekil 10** ve **Şekil 11**'da özetlenmiştir

### 4.1. Dokuda MDA düzeyleri

Genç ve orta yaşlı sıçanların kontrol grupları arasında pankreas MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark bulundu (sırasıyla,  $2.64 \pm 0.20$  nmol/g ve  $5.47 \pm 0.90$  nmol/g;  $p = 0.03$ ). Genç sıçanlarda; kontrol grubu ve deney grubu karşılaştırıldığında, pankreas MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. (sırasıyla;  $2.64 \pm 0.20$  nmol/g ve  $2.10 \pm 0.13$  nmol/g;  $p = 0.07$ ). Orta yaşlı sıçanlarda ise; kontrol grubu ve melatonin uygulanan grup karşılaştırıldığında pankreas MDA düzeyleri arasında, melatonin uygulanan grupta azalış gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. (sırasıyla;  $5.47 \pm 0.90$  nmol/g ve  $3.14 \pm 0.25$  nmol/g;  $p = 0.09$ )

### 4.2. Dokuda NOx düzeyleri

Genç ve orta yaşlı sıçanların kontrol grupları arasında pankreas NOx düzeyleri arasında yaşlanma ile birlikte bir artış gözlenmesine rağmen, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (sırasıyla;  $35.0 \pm 2.4$   $\mu$ mol/g ve  $51.0 \pm 6.3$   $\mu$ mol/g;  $p = 0.12$ ). Genç sıçanlarda; kontrol grubu ve deney grubu karşılaştırıldığında, pankreas NOx düzeyleri arasında anlamlı fark bulunamadı (sırasıyla;  $35.0 \pm 2.4$   $\mu$ mol/g ve

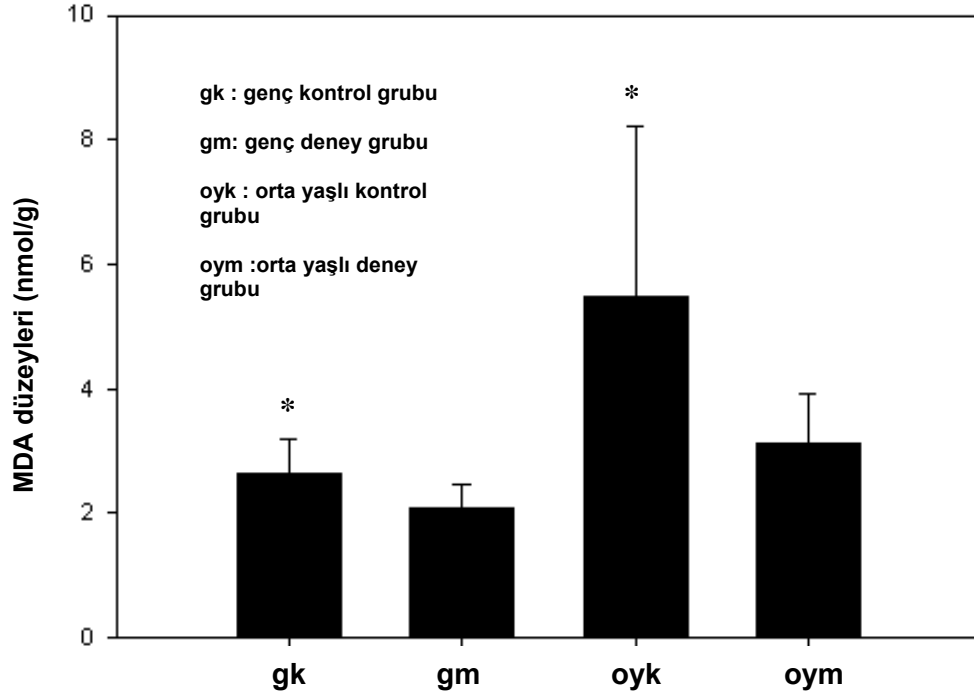
32.0±2.0 µmol/g ; p= 0.65). Orta yaşlı sıçanlarda ise; kontrol grubu ve melatonin uygulanan grup karşılaştırıldığında, pankreas NOx düzeyi anlamlı olarak azalmış bulundu (sırasıyla; 51.0±6.3 µmol/g ve 31.0±4.0 µmol/g ; p= 0.02)

#### **4.3. Dokuda GSH düzeyleri**

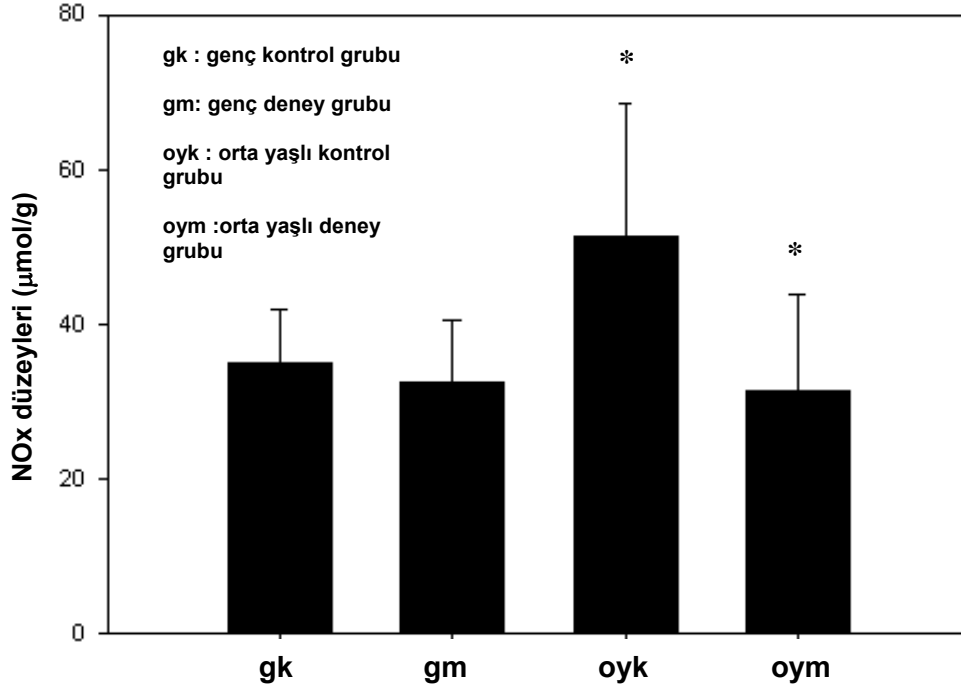
Genç ve orta yaşlı sıçanların kontrol grupları arasında pankreas GSH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (sırasıyla 1.08±0.07 µmol/gram ve 1.03±0.07 µmol/g ; p= 0.9). Genç sıçanlarda; kontrol grubu ve melatonin uygulanan grup karşılaştırıldığında pankreas GSH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu (sırasıyla; 1.08±0,07 µmol/g ve 1.33±0.08 µmol/g ; p= 0.04). Orta yaşlı sıçanlarda ise; kontrol grubu ve melatonin uygulanan grup karşılaştırıldığında, pankreas GSH düzeyleri arasında istatistiksel olarak artış bulundu (sırasıyla; 1.03±0.07 µmol/g ve 1.99±0.07 µmol/g; p= 0.0001).

**Tablo 4. Melatonin uygulanmayan ve uygulanan, genç ve orta yaşlı sıçanlarda pankreas dokusundaki MDA; NOx ve GSH düzeylerinin ortalama değerleri  $\pm$  standart hata ve istatistiksel olarak anlamlılığın ifadesi olan P değerleri**

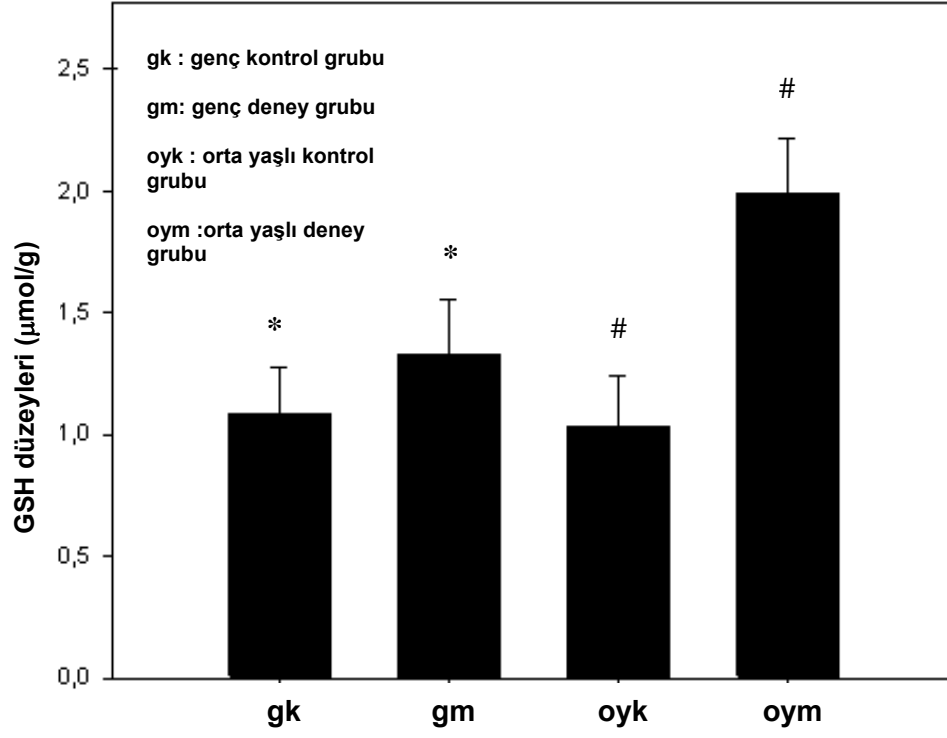
| Parametreler    | Genç kontrol (8) | Genç melatonin (8) | P            | Orta yaşlı kontrol (10) | Orta yaşlı melatonin (10) | P               |
|-----------------|------------------|--------------------|--------------|-------------------------|---------------------------|-----------------|
| MDA nmol/g      | 2.64 $\pm$ 0.20  | 2.10 $\pm$ 0.13    | 0.07         | 5.47 $\pm$ 0.90         | 3.14 $\pm$ 0.25           | 0.09            |
| NOx $\mu$ mol/g | 35.0 $\pm$ 2.40  | 32.0 $\pm$ 2.50    | 0.65         | 51.0 $\pm$ 6.30         | 31.0 $\pm$ 4.00           | <b>0.02 *</b>   |
| GSH $\mu$ mol/g | 1.08 $\pm$ 0.07  | 1.33 $\pm$ 0.08    | <b>0.04*</b> | 1.03 $\pm$ 0.07         | 1.99 $\pm$ 0.07           | <b>0.0001 #</b> |



**Şekil 9. Melatonin uygulanmayan ve uygulanan, genç ve orta yaşlı sıçanlarda pankreas dokusundaki MDA düzeyleri (nmol/g) \* P<0.05**



**Şekil 10. Melatonin uygulanmayan ve uygulanan, genç ve orta yaşlı sıçanlarda pankreas dokusundaki NOx düzeyleri (µmol/g) \* P<0.05**



**Şekil 11. Melatonin uygulanmayan ve uygulanan, genç ve orta yaşlı sıçanlarda pankreas dokusundaki GSH düzeyleri (µmol/g) \* P<0.05; # p<0.01**

## 5. TARTIŞMA

Yaşlanmayı açıklayabilmek için öne sürülen popüler teorilerden birisi de serbest radikal teorisi. Yaşlanma ile gözlemlenen serbest radikal düzeylerinin artışı ve antioksidan kapasitenin azalması bu teorisin önemli dayanaklarıdır. Organizmadaki oksidan stres ile antioksidan kapasite dengesinin oksidan stres lehine bozulması sonucu yaşlanma süreci hızlanmaktadır. Canlılar için serbest radikallerin yararlı ve zararlı etkileri çok hassas bir dengeyi oluşturur; bu denge redoks düzenleyicisi adı verilen sistem tarafından düzenlenir.<sup>59</sup> Redoks düzenleme sistemi oksidatif strese karşı canlıyı korur. Redoks dengesinin kanserde, diyabette, iskemi-reperfüzyon hasarında, ve yaşlanmada bozulduğu belirtilmiştir.<sup>60</sup> ROM'un ve RNM'nin yaşlanma ile birlikte görülen; nörodejeneratif hastalıklar, iskemi-reperfüzyon, sepsis gibi çeşitli patolojilerden sorumlu olduğu bildirilmiştir.<sup>61-64</sup> Yaşlanmaya karşı; her türün, bireyin, organın, dokunun, hücrenin bile farklı cevap verebileceği bildirilmiştir.<sup>69</sup>

Yaşlanma ile birlikte oksidatif strese bağlı hasar gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur.<sup>7-12</sup> Castello ve arkadaşlarının çalışmasında, oksidatif stresin yaşlı sıçanlarda genç sıçanlara göre anlamlı artışı bildirilmiştir.<sup>167</sup> Ayrıca, insan plazmasında<sup>65</sup>, lökositlerde<sup>66</sup> ve sıçan karaciğerinde<sup>168</sup> yaşlanma sonucu oksidatif hasar ile birlikte süperoksit yapımının artışı bildirilmiştir. Takabayashi ve arkadaşları çalışmalarında, oksidatif hasarın belirteci olarak kullanılabilen 8-OxodG düzeyini, 5 haftalık ve 20 aylık hamsterlarda ölçmüş, yaşlanma ile orta beyinde, serebellumda, akciğerde, kalpte, dalak ve böbrekte oksidatif stresi artmış bulurken; serebrumda, medulla oblongatada, karaciğer ve pankreasta anlamlı artış bulmamışlardır.<sup>169</sup>

Literatürde yaşlanma ve oksidatif stres ile ilgili çelişkili sonuçlar mevcuttur. Yaşlanma ile insan serumunda<sup>170</sup>, plazmasında<sup>171</sup>, sıçan karaciğerinde<sup>172</sup>, akciğerde<sup>168</sup>, MDA düzeyinin artış gösterdiğini bildiren çalışmaların yanı sıra; insan serumunda MDA düzeyinin değişmediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur.<sup>173,174</sup> Bizim çalışmamızda; yaşlanmaya bağlı olarak orta yaşlı sıçanların pankreas dokusunda MDA artışı anlamlı bulunmuştur. Bu veri literatürdeki, yaşlanma sonucu oksidatif stres artışını gösteren çalışmalar ile uyumludur.

Nitrik oksit ve onun yan ürünleri (RNM) mitokondriyal solunumu inhibe eder; hücre ölümünü uyararak ya da inhibe ederek var olan dengeyi korur. NO'nun fizyolojik konsantrasyondaki yapımı fonksiyonların sürdürülmesi için gerekli iken; orta ve yüksek düzeydeki yapımı oksidatif stresi tetiklemektedir.<sup>94</sup> NO oksidatif hasardan sorumlu bir moleküldür.<sup>47,71</sup> Yapılan çalışmalarda sıçan hepatosit hücrelerinde ve plazmasında yaşlanma ile iNOS aktivitesinin artışı bildirilmiştir<sup>67,168</sup>; bununla beraber sıçanda koroner endotel hücrelerinde eNOS aktivitesindeki azalma, yaşa bağlı olarak oluşan endotel hasarından sorumlu tutulmaktadır.<sup>68</sup>

Yaşlanma ile birlikte insan ve sıçanda çeşitli dokularda NO düzeylerinin arttığı bildirilmiştir.<sup>89,94,95,168,174</sup> NO aynı zamanda katalazı inhibe etmekte, hücresel glutatyonu azaltmaktadır. GPx' in inhibisyonu hücrelerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin artışı ile sonuçlanmaktadır.<sup>175,176</sup>

8-OxodG düzeyi oksidatif stresin göstergesi olarak kullanılabilir. Takabayashi ve arkadaşlarının çalışmasında, yaşa bağlı olarak pankreas 8-OxodG düzeyinde artma olmakla birlikte; bu artış anlamlı bulunmamıştır.<sup>169</sup> Oksidatif strese neden olabilen NOx düzeyi çalışmamızda yaşa bağlı olarak artış göstermekle birlikte, bu artış anlamlı

bulunmadı. Literatürde yaşlanmaya bağlı olarak pankreasta oksidatif stresi gösteren başka bir çalışmaya rastlanmadı.

Oksidan hasara karşı savunma elemanı olarak görev yapan endojen antioksidan düzeylerinin, yaşlanma ile birlikte değişmediği<sup>182</sup>, azaldığı, ya da arttığı bulunmuştur.<sup>177,178</sup> Yaşlanma ile total antioksidan kapasitenin negatif korelasyon gösterdiğinin belirtilmesine<sup>173</sup> rağmen; literatürde yaşlanma ile plazmada total antioksidan kapasitenin değişmediği de gösterilmiştir.<sup>171</sup>

Glutasyon hücreyi oksidatif strese karşı koruyan en önemli antioksidanlardandır.<sup>96,97</sup> Literatürde yaşlanma sonucu; glutasyon azalması<sup>179,180</sup> ile birlikte, glutasyon düzeyinin değişmediğini<sup>181</sup> gösteren çalışmalarda mevcuttur. Yaşlanma sonucu insan lökositlerinde, eritrositlerinde ve serumunda antioksidan enzim düzeyinin değişmediğini gösteren çalışmalar mevcuttur.<sup>170,174,182-184</sup> Bizim çalışmamızda orta yaşlı sıçanların kontrol pankreas GSH düzeyi genç sıçanlarınkine göre düşük bulunmasına karşın bu fark anlamlı bulunmadı.

Melatonin birçok biyolojik etkisinin yanısıra, güçlü bir radikal süpürücü ve antioksidan özelliğe sahiptir. Bilinen tüm antioksidanlardan (mannitol, glutasyon, vit E, C gibi) daha güçlü serbest radikal süpürücü özelliği vardır<sup>14</sup>. Melatoninin düzeyi memelilerde yaşlanma ile azalır<sup>126</sup>. Rasmussen ve arkadaşları; genç ve orta yaşlı sıçanlarda yaşa bağlı melatonin düzeyinde azalma bulmuşlardır<sup>125</sup>. Sağlıklı genç ve yaşlı bireylere melatonin uygulanması; MDA düzeyini azaltmış, SOD düzeyini arttırmıştır. Melatoninin antioksidan etkisinin gençler ile karşılaştırıldığında; yaşlılarda daha fazla olduğu bulunmuştur.<sup>170</sup>

Melatoninin  $\text{HO}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{NO}^\cdot$ ,  $\text{ONOO}^-$  gibi oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye ettiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebildiği bildirilmektedir.<sup>18,19</sup> In vitro ve in vivo şartlarda,  $\text{NO}^\cdot$  ve daha ileri aşamada  $\text{ONOO}^-$  oluşumuna neden olan nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinin, fizyolojik melatonin konsantrasyonlarında inhibe edildiği bildirilmektedir.<sup>115</sup> Beyin iskemi/reperfüzyon modelinde de, NOS inhibisyonuna yol açan melatoninin faydalı olabileceği öne sürülmektedir.<sup>116</sup> Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki melatoninin, antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırarak oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir.<sup>18,19</sup> Sıçanlara, akut/kronik uygulanan melatoninin beyin dokusu Mn-SOD ve CuZn-SOD sentezini artırdığı ve bu yolla oksidatif hasara karşı beyin dokusunu koruduğu gösterilmiştir.<sup>118</sup> Bununla birlikte; anne sıçana verilen melatoninin plasentadan geçebildiği ve fetus beyinde SOD ve GSH aktivitesini artırdığı gösterilmiştir.<sup>119</sup> Yaşlanma ile artış gösteren hastalıklarda; melatonin uygulanmasının oksidatif hasarı düzeltici etki gösterdiği bildirilmiştir.<sup>129,130</sup>

Yaşa bağlı olarak karaciğerde artan lipid peroksidasyonu ve  $\text{NO}$  düzeyi; melatonin veya büyüme hormonu uygulanması ile azalmaktadır.<sup>94</sup> Kimyasal bir karsinojen olan safrol, sıçanlara verildiğinde serbest radikal oluşumunu uyarmakta daha sonra bu radikaller çekirdekteki DNA'yı hasara uğratmaktadır. Reiter ve ark safrol ile melatonin verildiğinde bu etkinin tamamen ortadan kalktığını bildirmişlerdir.<sup>127</sup> Melchiorri ve ark parakuat ile indüklenen oksidatif hasarda melatoninin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 10 mg/kg dozunda uygulanan melatoninin sıçanlarda parakuatın neden olduğu lipid peroksidasyon ürünü düzeylerini azalttığı ve ayrıca akciğerlerdeki total GSH miktarını önemli ölçüde arttırdığını göstermişlerdir.<sup>185</sup> Pieri ve arkadaşlarının çalışmasında, radikal süpürücü özelliği bakımından melatonin E vitamininden daha etkili bulunmuştur.<sup>186</sup> Melatonin güçlü bir

radikal süpürücü olarak streptozotozinin neden olduğu diabetin yanı sıra alloksana karşı da pankreası koruyucu etki gösterir.<sup>22,25</sup> Caerulein ile oluşturulan deneysel pankreatitte; melatonin uygulanmasının yükselmiş MDA düzeyini azaltarak; pankreası oksidatif hasara karşı koruduğu bildirilmiştir.<sup>23</sup>

Casares ve arkadaşlarının çalışmasında; iskemi-reperfüzyonun neden olduğu oksidatif stres, pankreasta artmış LPO, azalmış enzimatik (CAT, SOD, GSH-Px) ve nonenzimatik (GSH) antioksidanlar ile birlikte. Melatonin tedavisi ile antioksidan enzimler artar iken; MDA-4HNE düzeyi azalmıştır.<sup>158</sup>

Çalışmamızda hem genç hem de orta yaşlı sıçanlara melatonin uygulandığında; pankreas GSH düzeyi anlamlı olarak artmıştır. Bu veri literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumludur.

Genç sıçanların pankreas MDA ve NOx düzeyleri kontrol grubu ile deney grubu karşılaştırıldığında; birbirinden farksızdı. Orta yaşlı sıçanlara melatonin uygulanması, pankreas NOx düzeyinde anlamlı azalmaya; GSH düzeyinde anlamlı artışa sebep olmuştur. Orta yaşlı sıçanlarda melatonin uygulanan grupta MDA düzeyi azalmış olmakla birlikte, anlamlı fark bulunamamıştır. Akbulut ve arkadaşlarının çalışmasında; genç sıçanlara melatonin uygulanması, kontrol grubuna göre akciğer MDA düzeyinde değişiklik yapmamıştır.<sup>8</sup>

Orta yaşlı sıçanlarda melatonin uygulaması gençler ile karşılaştırıldığında; hem radikal süpürücü hem de antioksidan özelliğini daha belirgin olarak göstermektedir. Kornatowska ve arkadaşlarının çalışmasında; genç ve orta yaşlı sıçanlar intra abdominal yağ, plazma insülin ve leptin düzeyleri bakımından araştırılmıştır. Yaşa bağlı olarak bu

parametreler artarken; melatonin düzeyi azalmıştır. Orta yaşlı sıçanlara melatonin uygulanması, azalmış melatonin düzeyini arttırmıştır. Genç gruba melatonin uygulanması yukarıdaki parametreler üzerinde etkili olmaz iken; orta yaşlı grupta bu parametreleri azaltarak etkili olmuştur.<sup>125</sup>

Çalışmamızda pankreas MDA düzeyi hem genç hem de orta yaşlı sıçanlarda melatonin uygulanması ile azalma eğiliminde olmasına karşın; olasılıkla denek sayısına bağlı olarak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bulgularımız, melatonin uygulanmasının; pankreas dokusunda total glutatyon miktarını artırarak bu organın serbest radikallere karşı savunmasını arttırdığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak; melatoninin hem direkt hidroksil radikali temizleme özelliği, hem de glutatyon üzerindeki etkisi ile pankreas dokusunun yaşlanmasında önemli rol oynadığını söyleyebiliriz. Literatürde yaşlanma ile pankreas dokusunda NOx, MDA ve GSH düzeylerinin değişimini birlikte içeren çalışmalara rastlanmamıştır, bu nedenle araştırmamızın özgün bir çalışma olduğunu düşünmekteyiz. Yaşlanmada glukoz intoleransının gelişiminde, serbest radikallerin rol oynadığı düşünülmektedir; ancak bunu desteklemek amacı ile diğer antioksidan enzim (SOD, CAT, GSH-Px...) düzeylerinin, endojen melatonin düzeyinin, glukoz ve insülin düzeylerinin; insülin ritminin melatonin ritmi ve glukoz insülin yanıtının birlikte araştırılması gerekmektedir. Ancak biz bu çalışmamızda ekzojen melatoninin etkisini araştırmayı amaçladık. Melatonin düzeyinin yaşlanma ile paralel olarak azaldığı göz önünde bulundurulacak olursa, klinikte yaşlanma ile paralel olarak sıklığı artan ve özellikle patogenezinde serbest radikallerin rol oynadığı düşünülen hastalıklarda, glukoz intoleransında, tip 2 diyabetin gelişiminde pankreas melatonin ilişkisinin araştırılması yararlı olabilir.

## 6. SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmamızdan elde edilen bulgular, yaşlanmayı açıklayan yardımcı teorilerden biri olan serbest radikal teorisini desteklemektedir. Ayrıca yaşlanma ile birlikte fizyolojik olarak melatonin düzeylerinin azaldığı göz önünde bulundurulursa; orta yaşlı deney grubumuzda izlenen değişiklikler, melatoninin de yaşlılık fizyolojisinde serbest radikal teorisi ile birlikte değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Tüm verilerin birlikte değerlendirilmesi sonucunda; orta yaşlı sıçanlarda ekzojen melatonin uygulanması ile serbest radikal düzeyleri azaltılabilir ve buna karşın antioksidan sistemin etkisi güçlendirilerek yararlı olabileceği söylenebilir.

## 7. ÖZET

### YAŞLANMA SÜRECİNDE PANKREAS DOKUSUNDA NO<sub>x</sub>, MDA, GSH DÜZEYLERİ VE MELATONİNİN ETKİSİ

#### THE EFFECTS OF MELATONINE ON THE LEVELS OF NO<sub>x</sub>, MDA, GSH IN THE PANCREATIC TISSUE DURING THE AGING PROCESS

Bu deneysel çalışmada melatoninin (10mg/kg sc 7 gün) genç (4 aylık n=16) ve orta yaşlı (14 aylık n=20) sıçanlarda pankreas dokusunda MDA, NO<sub>x</sub> ve GSH düzeyleri üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık.

Genç (n=8) ve orta yaşlı (n=10) sıçanların kontrol grupları karşılaştırıldığında, pankreas MDA düzeyleri arasında yaşlanma ile anlamlı artış bulundu (**sırasıyla; 2.64±0.2 nmol/g, 5.47±0.9 nmol/g; p= 0.03**). Pankreas NO<sub>x</sub> ve GSH düzeyleri, hem genç ve hem de orta yaşlı sıçanların kontrol grubunda birbirinden farksızdı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, genç (n=8) sıçanların deney grubunda pankreas GSH düzeyi anlamlı olarak artmıştır (**sırasıyla; 1.08±0.07 µmol/g, 1.33±0.08 µmol/g; p= 0.04**). Genç sıçanların kontrol grubu ile deney grubu arasında NO<sub>x</sub> ve MDA düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Orta yaşlı sıçanlar da ise, kontrol ve melatonin (n=10) grubu karşılaştırıldığında; pankreas NO<sub>x</sub> (**sırasıyla; 51.4±6.3 µmol/g, 31.4±4.0 µmol/g; p= 0.02**) düzeyinde anlamlı azalma, pankreas GSH düzeyinde (**sırasıyla; 1.03±0.07 µmol/g 1.99 ± 0.07 µmol/g; p= 0.0001**) anlamlı artma bulunur iken; pankreas MDA düzeyindeki azalma anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç olarak yaşlanma ile pankreas dokusunda serbest radikaller artarken; antioksidan savunma kapasitesinin azaldığı belirlenmiştir. Melatoninin ekzojen olarak verilmesinin; pankreas dokusunda serbest radikal düzeyini azalttığı ve antioksidan savunma sistemini güçlendirdiğı söylenebilir.

## 8. SUMMARY

### THE EFFECTS OF MELATONINE ON THE LEVELS OF NO<sub>x</sub>, MDA, GSH IN THE PANCREATIC TISSUE DURING THE AGING PROCESS

#### YAŞLANMA SÜRECİNDE PANKREAS DOKUSUNDA NO<sub>x</sub>, MDA, GSH DÜZEYLERİ VE MELATONİNİN ETKİSİ

In this experimental study we planned to investigate the effects of melatonin (10 mg/ kg sc 7 day) on the level of malondialdehyde (MDA) , nitric oxide (NO<sub>x</sub>) and glutathione (GSH) of pancreas tissues of young (4 months, n=16) and middle aged (14 months, n=20) rats.

There were significant differences in the MDA levels of pancreas tissues between the control groups of young (n=8) and middle aged (n=10) rats (**2.64±0.2 nmol/g, 5.47±0.9 nmol/g respectively p= 0.03**). NO<sub>x</sub> and GSH levels the pancreas tissues were not significantly different in the control groups of young and middle aged rats. There were significant differences in the GSH levels of pancreas tissues between the melatonin groups of young (n=8) when compared to control group (**1.08±0.07 µmol/g, 1.33±0.08 µmol/g respectively p= 0.04**). NO<sub>x</sub> and MDA level of the pancreas tissues were not significantly different melatonin groups of young (n=8) when compared to control groups.

While pancreas tissues NO<sub>x</sub> level were significantly lower (**31.4±4.0 µmol/g, 51.4±6.3 µmol/g respectively p= 0.02**) and GSH level were significantly high (**1.99 ±0.07µmol/g, 1.03±0.07 µmol/g respectively p= 0.0001**); in the melatonin group of middle aged rats when compared to control group. The MDA level of pancreas tissues were not significantly

different in melatonin groups of middle-aged when compared to control groups.

In conclusion, our results suggest that aging may be related with an increase in free radicals and a decrease in the antioxidant capacity of the tissues and exogenous melatonin may play a role in aging by means of its action on free radicals.

## 9. KAYNAKLAR:

1. Kopáni M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biró C, Oxidative stress and electron spin resonance, Clin Chim Acta 2006; 364 : 61-66.
2. Staroverov VN, Davidson ER, Distribution of effectively unpaired electrons, Chem Phys Lett 2000; 330 : 161-168.
3. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J 2003; 17 : 1195-1214.
4. Evans MD, Cooke MS, Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. Bio Essays 2004; 26 : 533-542.
5. Randerath K, Zhou GD, Monk SA, Randerath E, Enhanced levels in neonatal rat liver of 7, 8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxydeoxyguanosine), a major mutagenic oxidative DNA lesion. Carcinogenesis 1997; 18 : 1419-1421.
6. Akkuş İ, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1. Baskı, Konya, Mimoza Yayınları 1995.
7. Akbulut H, Akbulut KG, Gönül B, Age-related changes in malondialdehyde and glutathione levels of gastric mucosa of the rats and effects of exogenous melatonin, Digest Dis Sci 1997; 42 : 1381-1382.
8. Akbulut KG, Gönül B, Akbulut H : Differential effects of pharmacological doses of melatonin on MDA and GSH levels in young and old rats, Gerontology 1999; 45 : 67-71.

9. Nohl H, & Hegner, D, Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? Eur. J. Biochem 1978; 82 : 563-567.
10. Ames BN, Shigenaga MK & HagenTM, Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90 : 7915-7922.
11. Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC. & Beal MF, Oxidative damage to DNA shows marked age-dependent increases, Ann Neurol 1993; 34 : 609-616.
12. Hayakawa M, Torii K, Sugiyama S, Tanaka M & Ozawa T. Age-associated accumulation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991; 179 : 1023-1029.
13. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W, Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes, J Am Chem Soc 1958; 80 : 2587.
14. Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Wenbo QI; Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. Proc West Pharm Soc 1998; 41 : 229-36.
15. Fabris N, Biomarkers of aging in the neuroendocrine-immune domain, time for a new theory of aging. Ann NY Acad Sci 1992; 663 : 335-348.
16. Waldhauser F, Ehrhart B, Förster E, Clinical aspect of the melatonin action: Impact of the development, aging and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions, Experientia 1993; 49 : 671-681.

17. Arendt J., Melatonin. Clin Endocrinol 1988; 29 : 205-229.
18. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D; Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery. Biochem Pharmacol 1998; 56 : 1265-1272.
19. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E, Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. J Biomed Sci 2000; 7 : 444- 458.
20. Noyan A, Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, 14. Baskı, Ankara, Meteksan 2004.
21. Jaworek J, Konturek SJ, Tomaszewska R et al. The circadian rhythm of melatonin modulates the severity of caerulein-induced pancreatitis in the rat. J Pineal Res 2004; 37 : 161-170.
22. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J et al. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. Diabetes 1997; 46 :1733– 1742.
23. Eşrefoğlu M, Gül M, Ateş B, Batçioğlu K, Selimoğlu MA; Antioksidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats; World J Gastroenterol 2006; 12 : 259-264.
24. Jaworek J, Leja-Szpak A, Bonior J et al. Protective effect of melatonin and its precursor L- tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion J Pineal Res 2003; 34 : 40-52.

25. Ebelt H, Peschke D, Bromme HJ, Morke W, Blume R, Peschke E. Influence of melatonin on free radical-induced changes in rat pancreatic beta-cells in vitro. *J. Pineal Res* 2000; 28 : 65–72.
26. Campisi J, Cellular Senescence and Cell Death. “Physiological Basis of Aging and Geriatrics” 3 nd ed. Florida CRC Press, 2003.
27. Jazwinski SM, Aging and longevity genes, *Science*; 2000; 47 : 269–279.
28. Arvat E, Ceda GP, Di Vito L, Ramunni J, Gianotti L, Broglio F, Deghenghi R, et al. Age-related variations in the neuroendocrine control, more than impaired receptor sensitivity, cause the reduction in the GH-releasing activity of GHRPs in human aging: *Pituitary* 1998; 1 : 51-8.
29. Walker RF, Is aging a disease? *Aging Male* 2002; 5 : 147-69.
30. Hayflick L, Moorhead PS, The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, *Exp Cell Res* 1965; 37 : 614-36.
31. Elena Armandola: Time and the Biology of Aging. *Medscape General Med* 2005; 7 :1-4.
32. Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW, The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability, *Cell* 2001; 107 : 67-77.
33. Ferbeyre G, Lowe SW, The price of tumour suppression, *Nature* 2002; 415 : 26-7.
34. Troen BR, The biology of aging, *Mt Sinai J Med* 2003; 70 : 3-22.

35. Walburg HE, Radiation-induced life-shortening and premature aging, *Adv Radiat Biol* 1975; 5 : 145-79.
36. Orgel LE, The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging, *Proc Natl Acad Sci* 1963; 49 : 517-21.
37. Levine RL, Stadtman ER, Protein modifications with aging, 1 st ed, San Diego, Academic Pres 1996.
38. Adelman RC, Dekker EE. editors, Modern aging research, modification of proteins during aging, 1 New York, Alan R. Liss 1985.
39. Chavous DA, Jackson FR, O'Connor CM, Extension of the *Drosophila* lifespan by overexpression of a protein repair methyltransferase, *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98 : 14814-8.
40. Harman D, Aging a theory based on free radical and radiation chemistry, *J Gerontol* 1956; 11 : 298-300.
41. Aruoma O, Kaur H, Halliwell B, Oxygen free radicals and human diseases, *J Roy Soc Health*, 1991; 5 : 172-177.
42. Davydov VV, Dobaeva NM, Bozhkov AI, Possible role of alteration of aldehyde's scavenger enzymes during aging, *Exp Gerontology*, 2004; 39 : 11-16.
43. Cand F, Verdeti J, Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats, *Free Radic Biol Med* 1989; 7 : 59-63.

44. Linnane AW, Zhang C, Baumer A, Nagley P, Mitochondrial DNA mutation and the ageing process: bioenergy and pharmacological intervention, *Mutat Res*, 1992; 275 : 195-208.
45. Wallace DC, Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases *Science*, 1992; 256 : 628-32.
46. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla Mitochondrial TA, DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging *Science* 2005; 10 : 309-481.
47. Furchgott RF, Zawadzki JV, The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 1980; 288 : 373-6.
48. Halliwell B, Gutteridge JMC, *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3<sup>rd</sup> ed, London Oxford University Press. Inc, 1999.
49. Yang MH, Schaich KM, Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1996; 20 : 225-236.
50. Halliwell B, Aruoma OI, DNA damage by oxygen-derived species. its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* 1991; 281 : 9-19.
51. Wallace DC, Mitochondrial DNA in aging and disease. *Scientific American* 1997; 8 : 40-47.

52. Stevnsner T, Thorslund T, De Souza-Pinto NC, Bohr VA, Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exper Gerontology* 2002; 37 : 1189-1196.
53. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM, Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271 : 165-170.
54. Sastre J, Pallardo FV, Vina J, The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med* 2003; 35 : 1-8.
55. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes*, 1988; 14: 1114- 1120.
56. Dinçer Y, Akçay T, Alademir Z, İlkova H, Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 2002; 51: 1360-1362.
57. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, Luther T, Berentshtein E, Tritschler H, Muller M, Wahl P, Ziegler R and Nawroth PP, Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1997; 46 : 1481-1490.
58. Eidland A, Sebekova K, Schinzel R, Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *American J of Kidney Diseases* 2001;38 : 100-106.
59. Droge W, Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev* 2002; 82 : 47–95.

60. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin TDM, Mazur M, Telser J; Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The Inter J of Biochem & Cell Biology* 2007; 39 : 44–84.
61. Beal MF, Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1998, 1366 : 211-233.
62. Bockowski J, Lisdero CL, Lanone S, Samb A, Carreras MC, Boveris, A, Aubier, M and Poderoso JJ, Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia, 1999; 13 : 1637-1647.
63. Lenaz G, Role of mitokondria in oxidative stres and aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; 1366 : 53-67.
64. Murphy MP, Slip and leak in mitokondrial oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1989; 977 : 123-141.
65. Afanas'ev IB, Free radical mechanisms of aging processes under physiological conditions, *Biogerontology*, 2005; 6 : 283–290.
66. Chaves MM, Rodrigues ALP, Reis AP, Gerzstein NC and Noguera-Machado JA Correlation between NADPH oxidase and protein kinase C in the ROS production by human granulocytes related to age. *Gerontology* 2002; 48 : 354–359.
67. Pie JE, Baek SY, Kim HP, Ryu SD, Chung WG, Cha YN and Park CS, Age-related decline of inducible nitric oxide synthase gene expression in primary cultured rat hepatocytes. *Mol Cells* 2002; 13 : 399–406.

68. Amrani M, Goodwin AT, Gray CC and Yacoub MH, Ageing is associated with reduced basal and stimulated release of nitric oxide by the coronary endothelium. *Acta Physiol Scand* 1996; 157 : 79–84.
69. Linnane AW, Kios M, Vitetta L, The essential requirement for superoxide radical and nitric oxide formation for normal physiological function and healthy aging, *Mitochondrion*, 2007; 7 : 1–5.
70. Burçak G, Andican G, Oxidative DNA damage and aging. *Cerrahpaşa J Med*, 2004; 35 : 159-169.
71. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S, Nitric oxide release account for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* 1987; 327 : 524-6.
72. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA, Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite; implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87 : 1620-4.
73. Star RA, Nitric oxide, *Am J Med Sci* 1993; 306 (5): 348-58.
74. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A, Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Reviews* 1991; 43 (9) : 109-37.
75. Özkan M, Yüksekol İ, Nitrik Oksit ve Akciğerler *Toraks Dergisi*, 2003; 4(1) : 88-94.

76. Bloch KD, Wolfram JR, Brown DM, Roberts JDJ, Zapol DG, Lepore JJ, Filippov G, Thomas JE, Jacob HJ, Bloch DB, Three members of the nitric oxide synthase II gene family colocalize to human chromosome 17, *Genomic* 1995; 27 : 526-30.
77. Mohaupt MG, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox CS, Kone BC, Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthases in rat kidney. *Kidney Int*, 1994; 46 : 653-65.
78. Busse R, Fleming I, Schini VB, Nitric oxide formation in the vascular Wall: regulation and functional implications. *Curr Top Microbial Immunol* 1995; 196 : 7-18.
79. Nathan C, Xie QW, Nitric oxide synthases: roles, tolls, controls. *Cell* 1994; 78 : 915-8.
80. Marletta M.A., Approaches toward selective inhibition of nitric oxide synthase. *J Med Chem* 1994; 37 : 1899-907.
81. Nussler AK, Billiar TR, Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993; 54 (2) : 171-8.
82. Dawson TM, Snyder SH, Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 1994; 14 : 5147-59.
83. Dawson TM, Dawson VL, Nitric oxide: actions and pathological roles. *Neuroscientist* 1995; 1 : 7-18.
84. Meldrum B, Garthwaite J, Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11 : 379-87.

85. Oury TD, Ho YS, Piantadosi CA, Crapo JD, Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system O<sub>2</sub> toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89 : 9715-19.
86. Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE., Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 1993; 151 : 2132-41.
87. Aust AE, Eveleigh JF, Mechanisms of DNA oxidation. *PSEBM* 1999; 222 : 246-252.
88. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, And Castro L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria *Free Radical Biology & Medicine*, 2002; 33 : 1451–1464.
89. Yılmaz E, Yılmaz S, Karakurt L, Serin E, Orteoartritde nitrik oksit ve malondialdehid düzeyleri; *J Of Arthroplasty & Arthroscopic Surgery* 2004; 15 : 7-11.
90. Mccann, S.M., J. Licinio, M.L. Wong, et al, the nitric oxide hypothesis of brain aging. *Exp. Gerontol.* 1997; 32 : 431–440.
91. Radi, R, Cassina, A, Hodara R, Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol. Chem.* 2002; 383 : 401–409.
92. Beckman JS, Estevez AG, Crow JP, Barbeito L. Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. *Trends Neurosci* 2001; 24 : 15-20.

93. Demiryürek Ş, Turan NN, Demiryürek AT, Peroksinitritin akciğerlerdeki etkileri ve akciğer hastalıklarındaki rolü, Genel Tıp Derg 2004; 14(4) :163-169.
94. 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(3-5) : 318-26.
95. McCann SM, Mastronardi C, De Laurentiis A and Rettori V, The nitric oxide theory of aging Revisited Ann. N.Y. Acad. Sci. 2005; 1057 : 64–84.
96. Nordberg J, Arner ESJ, Reactive oxygen species, antioxidant and the mammalian thioredoxin system, Free Radic. Biol. Med. 2001; 31 : 1287–1312.
97. Das SK, Vasudevan DM, Biochemical diagnosis of alcoholism, Ind. J. Clin. Biochem. 2005; 20 : 35–42.
98. Masella, R, Benedetto DI, Vari R, Filesi RC & Giovannini, C. . Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J. Nutr. Biochem. 2005; 16 : 577–586.
99. Wu G, Fang YZ, Yang S, et al.: Glutathione metabolism and its implications for health, J Nutr, Mar 2004; 134(3) : 489-92.
100. Pastore A, Federici G, Bertini E & Piemonte F. Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. Clin. Chim. Acta. 2003; 333 : 19–39.

101. Seto NOL, Hayashi S and Tener GM, Overexpression of Cu-Zn Superoxide dismutase in *Drosophila* does not affect life-span; *Nat Aca Sciences*, 1990; 87 : 4270-4274.
102. Calvo J, Boya J, Borregon A, Garcia-Maurino JE, Presence of glial cells in the rat pineal gland; a light and electron microscopic immunohistochemical study. *The anatomical Record*, 1988; 220 : 424-428.
103. Vermeulen M, Palermo M, Giordano M, Neonatal pinealectomy impairs murine antibody-dependent cellular cytotoxicity, *J Neuroimmunol*, 1993; 43 : 97-102.
104. Huether G, Poeggler B, Reimer A, Effects of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci* 1992; 51: 945–953.
105. Brzezinski A, Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997; 336: 186-195.
106. Reiter RJ, Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian J Med Biol Res* 1993; 26: 1141-1155.
107. Reiter R.J., Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991, 12 : 151-180.
108. Axelrod J., The pineal gland: A neurochemical transducer. *Science* 1974; 184 :1341-1348.

109. Ronco AL, Halberg F; The pineal gland and cancer. *Anticancer Res*, 1996; 16 : 2033-2040.
110. Iguchi H, Kato KI, Ibayashi Y; Melatonin serum levels and metabolic clearance rate in patients with liver cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54 : 1025-1027.
111. Weaver DR, Stehle JH, Stopa EG; melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. *J Clin Endocrinol & Metab*. 1993; 76(2) : 295-300.
112. Muhlbauer E and Peschke E, Evidence for the expression of both the MT1- and in addition, the MT2-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and b-cell (letter to the editor) *J. Pineal Res*. 2007; 42:105–106.
113. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX, The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin, antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17: 347-357.
114. Yazıcı C, Köse K, Melatonin: the antioxidant power of darkness; *E.Ü.Journal of Health Sciences*, 2004; 13(2) : 56-65.
115. Bettahi I, Guerrero JM , Reiter RJ , Osuna C, Physiological concentrations of melatonin inhibit the norepinephrine-induced activation of prostaglandin E2 and cyclic AMP production in rat hypothalamus: a mechanism involving inhibition of nitric oxide synthase. *J Pineal Res*. 1998; 25 : 34-40.

116. Guerrero JM, Reiter RJ, Ortiz GG, Pablos MI, Sewerynek E, Chuang JI, Melatonin prevents increases in neural nitric oxide and cyclic GMP production after transient brain ischemia and reperfusion in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). J Pineal Res. 1997; 23 : 24-31.
117. Reiter RJ, Melatonin: clinical relevance. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2003; 17 : 273-285.
118. Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, Menendez-Pelaez A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. J Pineal Res 1998; 24 : 83- 89.
119. Thomas L, Drew JE, Abramovich DR, Williams LM. The role of melatonin in the human fetus (review). Int J Mol Med. 1998; 1 : 539-543.
120. Pahkla R, Zilmer M, Kullisaar T, Rago L. Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline in vitro. J Pineal Res 1998; 24 : 96-101.
121. 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.
122. Reiter RJ: Pineal function during aging: Attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. Acta Neurobiol exp, 1994; 54 : 31-39.
123. Sack RL, Lewy AJ, Erb DL, Human melatonin production decreases with age. J pineal Res, 1986; 3; 379-388.

124. Touitou Y, Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Exp Gerontology* 2001; 36 : 1083-1100.
125. 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 (1) : 89–94.
126. Reiter RJ, Garcia JJ, Pie J, Oxidative toxicity in models of neurodegeneration: Responses to melatonin. *Rest. Neurol. Neurosci.* 1998; 12 :135-142.
127. Reiter J. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 1995; 16 : 383-415.
128. Parlakpınar H, Sahna E, Ozer MK, Ozugurlu F, Vardi N, Acet A. Physiological and pharmacological concentrations of melatonin protect against cisplatin-induced acute renal injury. *J Pineal Res* 2002; 33(3) : 161-6.
129. Reiter RJ, Tan D-X, Kim SJ, Manchester LC, Qi W, Garcia JJ, Cabrera et al. Augmentation of indices of oxidative damage in life-long melatonin-deficient rats; *Mech. Aging Develop.* 1999; 110 : 157-173.
130. Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR; Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo, 2000; 9 : 160-171.
131. Mollaoğlu H, Özgüner MF; Yaşlanma sürecinde melatoninin rolü *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2005; 12(3) : 52-56.

132. Guyton AC, Pancreas. Textbook of medical physiology. 6, London: W.B. Saunders company; 1981.
133. Janowitz P, Swobodnik W, Wechsler JG, et al. Nucleation time and age in patients with gallstones . Z Gastroenterol 1990; 28: 571-573.
134. Hildebrand B, Beglinger C, Gyr K; et al. Effect of CCK reseptor antagonist on intestinal phaseof pancreatic and biliaryresponses in man. J Clin Invest 1990; 85 : 640-6.
135. Kreel L, Sandin B, Changes in pankreatic morphology associated with aging; Gut 1973; 14: 962.
136. Saltzman JR, Russell RM, Nutritional, physiologic and pathophysiologic considerations of the gastrointestinal tract; the aging gut nutritional issues: Gastroenterol Clinics 1998; 27 : 315.
137. Laugier R, Bernard JP, Berthezene P; et al. Changes in pancreatic exocrine secretion with age: Pancreatic exocrine secretion dose decrease in eldery, Digestion, 1991; 50: 202-211.
138. Gurer-Orhan H, Orhan H, Suzen S et al. Synthesis and evaluation of in vitro antioxidant capacities of some benzimidazole derivatives. J Enzyme Inhib Med Chem 2006; 21 : 241–247.
139. Timiras PS, The Endocrine Pankreas, Diffuse Endocrine Glands And Chemical Mediators, 1 California CRC Pres LLC, 2003.
140. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V,  $\beta$ -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative street in type 2 diabetes. Diabetes 2004; 1 : 119-124.

141. Ceriello A, Acute hyperglycemia and oxidative stress generation, *Diabetic Medicine* 1997; 14 : 45-49.
142. Giugliano I, Ceriello A, Paolisso G, Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19 : 257-267.
143. Rösen P, Du X, Tschöpe D Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by  $\alpha$ -tocopherol?. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1998; 188(1-2) : 103-111.
144. Du X, Stockklauser-Farber K, Rösen P, Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF $\kappa$ B, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radic Bio and Medic* 1999; 27(7-8) : 752-763.
145. Tiedge M, Lortz S, Munday R et al. Protection against the co-operative toxicity of nitric oxide and oxygen free radicals Peschke 38 by overexpression of antioxidant enzymes in bioengineered insulin-producing RINm5F cells. *Diabetologia* 1999; 42 : 849– 855.
146. Houslay MD, 'Crosstalks, a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Euro J Biochem* 1991;195(1) : 9-27.
147. Eizirik DL, Flodström M, Karlén AE, Welsh N The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic  $\beta$  cells. *Diabetologia* 1996; 39(8) : 875-890.
148. Baynes JW, Thorpe SR Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48(1) : 1-9.

149. Altan N, Ongun CÖ, Hasanoğlu E, Engin A, Tuncer C, Sindel P effects of the sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase activity in alloxan-induced diabetic rat hepatocytes. *Diabetes Res and Clin Prac* 1994; 22(2-3) : 95-98.
150. Altan N, Ongun CÖ, Elmalı E, Kılıç N, Yavuz Ö., Sancak B, Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Glutathione and Glutathione peroxidase activity in Alloxan Induced Diabetic Rat Hepatocytes. *Gen Pharma* 1994; 25(5) : 875-87.
151. Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochem Pharma* 1993; 45(3) : 539-542.
152. Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiani H, Seino Y, Yamada Y, Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic  $\beta$  cells of GK rats , a model of type 2 diabetes. *Diabetes*, 1999; 48(4) : 927-932.
153. Davidoff AJ, Rodgers RL Insulin, thyroid hormone, and heart function of diabetic spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1990; 15(6) : 633-642.
154. Das K, Chainy GBN Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defense system by thyroid hormone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2001; 1537(1): 1-13.
155. Altan N, Buğdaycı G, Tutkun-Kosova F, Sancak-Çaycı B, Nazaroğlu NK The Influence of the Sulfonylurea Glyburide on Nitric Oxide in Streptozotocin Induced Diabetic Rat. *General Pharmacology* 1998; 31(2) : 319-321.

156. Ries LAG, Eisner MP, Kasary CL, et al. SEER Cancer Statistic Review National Cancer Institute 1973-1992, Bethesda 2000.
157. Peschke E, Melatonin, endocrine pancreas and diabetes, J. Pineal Res. 2008; 44 : 26–40.
158. Casares FCM, Javier FJP, Collado BJA, Munoz-Castaneda JR, Cruz ROA, Montilla ITP, Pera C, and Muntane J; Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas, J. Pineal Res. 2006; 40 : 195–203.
159. Jaworek J, Nawrot K, Konturek SJ et al. Melatonin and its precursor; L-tryptophan: influence on pancreatic amylase secretion in vivo and in vitro. J Pineal Res 2004; 36 : 156-164.
160. Leja-Szpak A, Jaworek J, Nawrot K et al. Modulation of pancreatic enzyme secretion by melatonin and its precursor; L-tryptophan. Role of CCK and afferent nerves. J Physiol Pharmacol 2004; 55 : 441-451.
161. Dillman WH. Heat shock proteins and protection against ischemic injury. Infect Dis Obstet Gynecol 1999; 7 : 55-57.
162. Ruiz-Rabelo JF, Vázquez R, Perea MD, Cruz A, González R; Romero A, Muñoz-Villanueva MC, Túnez I, Montilla P, Muntané J, Padillo JF; Beneficial properties of melatonin in an experimental model of pancreatic cancer; J. Pineal Res. 2007; 43 : 270-275.
163. Beckman KB, Ames BN: Endogenous oxidative damage of mtDNA, Mutat Res, 1999; 424 : 51-58.

164. Sastre J, Pallardo FV, Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis, IUBMB life, 2000; 49 : 427-435.
165. Griess, P, Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt Ueber einige azoverbindungen.. Chem. Ber. 1879; 12 : 426.8.
166. Yu BP, Aging and oxidative stress, modulation by dietary restriction, Free Rad Biol Med 1996; 21 : 651-668.
167. Castello L, Froio T, Cavallini G, Biasi F, Sapino A, Leonarduzzi G, Bergamini E, Poli G and Chiarpotto E, Calorie restriction protects against age-related rat aorta sclerosis. The FASEB 2005; 19 : 1863-1865.
168. Escames G, López CL, Ortiz F, Ros E and Acuña-Castroviejo D; Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: Effects of melatonin treatment. Experimental Gerontology 2006; 41: 1165-1173.
169. Takabayashi F, Tahara S, Kaneko T, Miyoshi Y, Harada N; Accumulation of 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine (as a biomarker of oxidative DNA damage) in the tissues of aged hamsters and change in antioxidant enzyme activities after single administration of N-Nitrosobis(2-Oxopropyl) amine, Gerontology 2004; 50 : 57-63.
170. Kornatowska KK, Golec K, Czuczejko J, Lumen KM, Pawluk H, Motyl J, Karasek M, Kędziora J; Effect of melatonin on the oxidative stress in erythrocytes of healthy young and elderly subjects J Pineal Res. 2007; 42 (2) : 153-158.

171. Kostka T, Draï J, Berthouze SE, Lacour J.-R and Bonnefoy M, Physical activity, aerobic capacity and selected markers of oxidative stress and the anti-oxidant defence system in healthy active elderly men; Clin Physiology 2000; 3: 185-190.
  
172. Chiarpotto E, Biasi F, Scavazza A, Camandola S, Dianzani MU and Poli G, Metabolism Of 4-Hydroxy-2-Nonenal and aging., Biochem. Biophys. Res. Co, 1995; 207 : 477-484.
  
173. Karolkiewicz J, Placzynska-Szczesniak L, Maciaszek J, Osinski W. Insulin resistance, oxidative stress markers and the blood antioxidant system in overweight elderly men. The Aging Male 2006; 9(3) : 159-163.
  
174. Kasapoglu M, Özben T; Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging; Exper Gerontol 2001; 36 : 209-220.
  
175. Poderoso JJ, Peralta JG, Lisdero CL, Carreras MC, Radisic M, Schöpfer F, Cadenas E, Boveris A.; Nitric oxide regulates oxygen uptake and hydrogen peroxide release by the isolated beating rat heart.; Am J Physiol. 1998; 274(1) : 112-9.
  
176. Brown GC; Reversible binding and inhibition of catalase by NO. Eur J. Biochem. 1995; 232 : 188-191.
  
177. Barja de Quiroga G, López-Torres M, Pérez-Campo R; Relationship between antioxidants, lipid peroxidation and aging, EXS. 1992; 62: 109-23.
  
178. Benzi G, Moretti A, ge- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system, Free Radical Biol; 1995; 12 : 75-101.

179. Mallikarjuna K, Nishanth K, Sathyavelu RK, Hepatic glutathione mediated antioxidant system in ethanol treated rats: Decline with age, *Pathophysiology* 2007; 14 : 17–21.
180. Kim YC, Kim YS, Sohn YR, Effect of age increase on metabolism and toxicity of ethanol in female rats, *Life Sci.* 2003; 74 : 509–519.
181. Lipman RD, Bronson RT, Wu D, Smith DE, Prior R, Cao G, Han SN, Martin KR, Meydani SN, Meydani M Disease incidence and longevity are unaltered by dietary antioxidant supplementation initiated during middle age in C57BL/6 mice. *Mech. Ageing Dev.* 1998; 103 : 269–284.
182. Barnett YA, & King CM Investigation of antioxidant status. DNA-repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mut. Res.*, 1995; 338 : 115–128.
183. Karolkiewicz J, Szczęśniak L, Deskur-Smielecka E, Nowak A, Stemplewski, Szeklicki R. Oxidative stress and antioxidant defence system in healthy, elderly men. The relationship to physical activity. *The Aging Male* 2003; 6 : 100-105.
184. Pilaczniska-Szczęśniak L, Karokiewicz J, Strzelczyk A, Stankiewicz K, Osinski W, Stemplewski R, Szeklicki R. Melatonin concentrations and other parameters of blood antioxidant defence system in elderly men with various levels of physical activity. *Pol Arch Med Wew* 2004; 5(5) : 557-562.
185. Melchiorri D, Reiter RJ, Attia AM, Hara M, et al.: Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats, *Life Sci*, 1994; 56 : 83-89.

186. Pieri C, Maura M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F, Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E, *Life Sci*, 1994; 55 : 271-276.

## **10. EKLER**

### **10.1. Teşekkür**

Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimimde büyük emekleri olan sayın hocalarım Prof. Dr. Deniz Erbaş'a, Prof. Dr. Bilge Gönül'e, Prof. Dr. Aydan Babül'e, Prof. Dr. Lamia Pınar'a, Prof. Dr. Sibel Dinçer'e, Doç. Dr. Kazime Gonca Akbulut'a, Doç. Dr. Çiğdem Özer'e en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımı yönlendiren ve güler yüzünü esirgemeyen hocam Doç. Dr. Kazime Gonca Akbulut'a teşekkürlerimi bildirmekten onur duyarım.

İhtiyaç duyduğum her an ilgisini esirgemeyen ve deneyimleri ile yardımcı olan; Dr. Şevin Güney'e ve değerli bir dostum olan Biyolog Levent Biler'e teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım boyunca desteğini esirgemeyen aileme teşekkür etmekten kıvanç duyarım.

Ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince birlikte olduğum tüm arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

**Haziran 2008,**  
**Biyolog Hakan Yüzüak**



## 10.2. Etik Kurul Onayı

T.C.  
**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**REKTÖRLÜĞÜ**  
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/ 13-2544  
KONU:

13.02.2008

Sayın

**Doç.Dr.Gonca AKBULUT**  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı  
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-08.001 kod numaralı ve *“Yaşlanma sürecinde melatoninin; oksidan stres ve antioksidan sistem üzerindeki etkisinin (karaciğer, böbrek, dalak, pankreas, testis, göz merceği dokularında) belirlenmesi”* başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi 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-08.001 and entitled *“Identifying the effect of melatonin which is in the old ages; on oxidant stress and antioxidant system (liver, kidney, spleen, pancreas, testis, lens tissues)”* is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.

With my best regards.

**Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN**  
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı  
Chairman  
Gazi University Experimental Animals Ethical Council

**Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER**

**Prof.Dr.Nedret KILIÇ**

**Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN**

**Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN**

**Prof.Dr.Deniz ERBAŞ**

**Prof.Dr.Fatma AKAR**

**Prof.Dr.Altan DOĞAN**

**Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU**

**Uzman Dr.Şeyda DİKER**

## **11. ÖZGEÇMİŞ**

**Adı:** HAKAN

**Soyadı:** YÜZÜAK

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Ankara / 5 Kasım 1982

### **EĞİTİMİ:**

**2006–2008** Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü;  
Fizyoloji Anabilim Dalı  
(Yüksek Lisans Eğitimi)

**2000 – 2006** Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü  
(Lisans Eğitimi)

**1996 – 1999** Türközü Şehit Nuri Pamir Lisesi (Ank)

**1993 – 1996** Türközü Şehir Nuri Pamir Ortaokulu (Ank)

**1988 – 1993** Boztepe İlköğretim Okulu (Ank)

**Yabancı Dili:** İngilizce