

**T. C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL RAT MENOPOZ MODELİNDE MELATONİN'İN ROS
VE NMDA RESEPTÖRLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

Dr. Müfide DİLEK

**DANIŞMAN
Prof. Dr. H. Baha ORAL**

ISPARTA-2009

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarıma Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. M.Tamer Mungan başta olmak üzere özellikle tez danışman hocam Prof. Dr. H.Baha Oral'a sonsuz şükran ve saygılarımı sunarım.

Asistanlığım süresince ilgi ve yardımlarını gördüğüm asistan arkadaşlarıma başta Dr. Murat Bulut, Dr. Fatma Korkmaz ve Dr. Meltem Antalyalı olmak üzere ayrı ayrı teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında bana yol gösteren, bilgi ve desteğini esirgemeyen Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu ve tüm Biyofizik asistanlarına teşekkür ederim.

Biyokimyasal analizlerdeki yardımlarından dolayı Biyokimya A.B.D Öğretim üyesi Doç. Dr. Recep Sütçü'ye ve asistanlarına teşekkür ederim.

Asistanlığım sırasında bana gösterdikleri sevgi ve sabırdan dolayı başta eşim Dr. Mustafa Dilek olmak üzere kızlarım Sena, Selin ve Selmin'e teşekkür eder, tezimin yazımı sırasındaki yardımlarından dolayı kızım Sena'ya ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Menopoz.....	2
2.1.1. Menopoz'un Tanımı.....	2
2.1.2. Menopozal Yakınmalar.....	3
2.1.2.1. Nörovejetatif Semptomlar.....	3
2.1.2.2. Kardiyolojik Değişiklikler.....	7
2.1.2.3. Deri Değişiklikleri.....	8
2.1.2.4. Saç ve Kıllanma Değişiklikleri.....	9
2.1.2.5. Ürogenital Sistem Değişiklikleri.....	9
2.1.2.6. Cinsel Yaşam Değişiklikleri.....	10
2.1.2.7. Osteoporoz.....	11
2.2. Serbest Radikaller.....	13
2.2.1. Serbest Radikallerin Tanımı ve Oluşumu.....	13
2.2.2. Serbest Radikal Kaynakları.....	14
2.2.3. Serbest Oksijen Radikalleri.....	18
2.2.4. Reaktif Nitrojen Radikalleri.....	20
2.2.5. Oksidatif Hasar.....	21
2.3. Antioksidanlar.....	25
2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	26
2.3.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar.....	28
2.4. NMDA Reseptörleri.....	40
2.4.1. Hipokampusun Anatomisi, Yapısı ve Fonksiyonları.....	40

2.4.2. Glutamat Reseptörleri	41
2.4.2.1. NMDA Reseptörleri	42
3. MATERYAL ve METOD	48
3.1. Materyal	48
3.1.1. Çalışma Grubu	48
3.1.2. Çalışma Planı	48
3.2. Metod	51
3.2.1. Ros Çalışmaları	53
3.2.2. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu	55
3.2.3. İstatistiksel Analiz	56
4. BULGULAR	57
4.1. Rat Ağırlıkları	57
4.2. Ros Ölçümleri	58
4.3. Hipokampus NMDA Reseptör Ölçümleri	61
4.3.1. NR2A Ölçümleri	62
4.3.2. NR2B Ölçümleri	63
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇLAR	71
7. KAYNAKLAR	72

KISALTMALAR

AANAT	: Arilalkilamin N-asetil transferaz
AFMK	: N1-aseti-N2-formil-5-metoksi kyanuramin
AH	: Alzheimer Hastalığı
AMPA	: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionat
AMPAR	: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionat reseptörü
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz enzimi
BSA	: Bovine serum albumin
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CAT	: Katalaz
Ca	: Kalsiyum
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
Cu	: Bakır
CYP 450	: Sitokrom P 450
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
ELISA	: Enzim Bağlı İmmün Assay
EPO	: Eritropoietin
ETZ	: Elektron Transport Zinciri
Fe	: Demir
FSH	: Follikül Stimulan Hormon
GABA	: Gama aminobütirik asit
GnRH	: Gonadotropin Salıverici hormon
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutatyon
GSSG-Rd	: Glutatyon redüktaz
Hb	: Hemoglobin
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HO.	: Hidroksil radikali

HOCl	: Hipokloröz asit
HRT	: Hormon Replasman Tedavisi
4-HNE	: 4-hidroksinonenal
HPLC	: Yüksek performanslı likid kromatografisi
I/R	: İskemi-reperfüzyon
iGluR	: İyonotropik glutamat reseptörü
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LH	: Lüteinizan Hormon
LPO	: Lipid peroksidasyonu
LTP	: Long term potansializasyon
KAR	: Kainat tercih eden reseptörler
K⁺	: Potasyum
MDA	: Malondialdehit
MEL	: Melatonin
mRNA	: Mesajcı RNA
Mg	: Magnezyum
Mn	: Mangan
MT1	: Yüksek afiniteli melatonin reseptörü alt tipi
MT2	: Düşük afiniteli melatonin reseptörü alt tipi
Na⁺	: Sodyum
NADPH	: Redükte Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NMDAR	: N-metil-D-aspartat reseptörü
NO	: Nitrik oksit
NO₂	: Nitrojen dioksit
N₂O₃	: Dinitrojen trioksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NO₂⁺	: Nitril katyon
NR 2A	: NMDAR 2A subuniti
NR 2B	: NMDAR 2B subuniti
3-NT	: 3-Nitrotirozin
O₂	: Moleküler Oksijen

O₂⁻	: Süperoksit radikali
ONOO⁻	: Peroksinitrit
ONOOH	: Peroksinitröz asit
OD	: Optik dansite
PKA	: Proteinkinaz A
PKC	: Proteinkinaz C
PTH	: Paratiroid Hormon
REM	: Rapid Eye movement
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SCN	: Suprakiazmatik Nükleus
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TAH+BSO	: Total Abdominal Histerektomi+Bilateral Salpingooferektomi
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Trikloro asetik asit
TSE	: Türk Standartları Enstitüsü
TTBS	: Tris-Tween-Buffer Saline
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
XO	: Ksantin Oksidaz
Zn	: Çinko

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Serbest radikallerin endojen ve ekzojen kaynakları	15
Tablo 2. Oksijenden oluşan toksik metabolitler	19
Tablo 3. Reaktif nitrojen radikalleri	20
Tablo 4. Ortalama rat ağırlıkları	57
Tablo 5. Beyin dokusunda MDA, GSH-Px ve GSH düzeylerinin gruplara göre dağılımı	58
Tablo 6. Çalışma grupları beyin dokusu ortalama MDA, GSH-Px, GSH düzeyleri (Ortalama \pm SD).....	58
Tablo 7. Tüm gruplarda NR2A, NR2B reseptör yoğunlukları ortalama ve \pm SEM değerleri	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Endojen serbest radikallerin oluşumu.....	16
Şekil 2. Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu klinik tablolar	20
Şekil 3. Oksidatif stres ve antioksidan savunma arasındaki denge.....	22
Şekil 4. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünler	23
Şekil 5. MDA'nın yapısı.....	24
Şekil 6. Enzimatik antioksidanlar ve etki mekanizmaları.....	26
Şekil 7. N-asetil-5metoksitriptamin (Melatonin).....	29
Şekil 8. Melatonin sentezi.....	30
Şekil 9. Melatonin sentezinin kontrolü	31
Şekil 10. Melatoninin immün sistem üzerine etkileri.....	36
Şekil 11. Melatoninin antioksidan fonksiyonu	39
Şekil 12. Hipokampus ve limbik sistem	40
Şekil 13. Gruplar arası GSH grafiği.....	59
Şekil 14. Gruplar arası MDA grafiği	60
Şekil 15. Gruplar arası GSH-Px grafiği.....	61
Şekil 16. NR2A'ya ait Western Blot örneği	62
Şekil 17. NR2B'ye ait Western Blot örneği	63

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Ratların overektomi görüntüleri	50
Resim 2. Hipokampus çıkartma düzeneği	53
Resim 3. Hipokampus örneklerinden Western Blot yöntemi ile elde edilen bantların NR2A'ya ait görünümü	62
Resim 4. Hipokampus örneklerinden Western Blot yöntemi ile elde edilen bantların NR2B'e ait görünümü.....	63

ÖZET

DENEYSSEL RAT MENOPOZ MODELİNDE MELATONİN'İN ROS VE NMDA RESEPTÖRLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışmada amacımız cerrahi menopoza yapılarak estrogen eksikliği oluşturulan dişi ratlarda beyinde serbest oksijen radikallerindeki ve NMDA reseptör düzeylerindeki değişiklikleri saptamak ve melatoninin antioksidan özelliğinden yararlanarak beyin dokusunda serbest oksijen radikalleri ve NMDA reseptörleri üzerine herhangi bir etkisi olup olmadığını araştırmaktır. Bu çalışma sonucunda belkide antioksidanlardan melatonin klinikte Hormon Replasman Tedavisi'ne bir alternatif olabilir.

Materyal-Metot: Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde yetiştirilen, Wistar Albino cinsi 32 adet dişi rat kullanıldı. Ratlar üç gruba bölündü.

- 1) Overektomize +Melatonin grubu (OV+MEL; n=11)
- 2) Overektomize grup (OV; n=11)
- 3) Kontrol grubu (K; n=10)

Birinci gruba; Overektomi yanında, 10 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal enjeksiyonla MEL,

İkinci gruba; Overektomi+0.12ml serum fizyolojik intraperitoneal

Üçüncü grup olan kontrol grubuna ise aynı süre boyunca 0.12 ml serum fizyolojik intraperitoneal enjekte edildi.

Araştırmanın sonunda ratlar dekapite edilerek deney sonlandırıldı. Beyin dokusu örnekleri alınarak ROS üretimi göstergesi olan lipid peroksidasyon analizleri (MDA, GSH-Px, GSH) ve hipokampus NMDA reseptör düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Kilo alımı kontrol grubuna göre melatonin grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.05$). MDA olarak ölçülen lipid peroksidasyon değeri kontrole göre overektomize grupta anlamlı olarak daha yüksek iken ($p<0.05$), overektomize gruba göre melatonin grubunda anlamlı derecede daha düşüktü ($p<0.05$). NR2B NMDA reseptörleri ve redükte glutatyon düzeyleri kontrole göre overektomize grupta anlamlı olarak düşüktü. Oysa overektomize gruba göre overektomize+melatonin grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu. Glutatyon peroksidaz aktivitesi ise gruplar arasında farklılık göstermedi.

Sonuç: Melatoninin overektomize ratlarda NMDA reseptörleri ve oksidatif stres üzerine koruyucu etkilerinin olduğunu gözlemledik.

Anahtar Kelimeler: Menopoz, Melatonin, Oksidatif Stres.

ABSTRACT**EFFECTS OF MELATONIN ON BRAIN NMDA RECEPTORS AND ROS IN
EXPERIMENTAL RAT MENOPAUSE MODEL**

Aim: Brain is sensitive to oxidative stress because it is containing rich unsaturated fatty acids. It is well known that estrogen deficiency in menopause causes brain stroke and degeneration. Melatonin is strong antioxidant and it can be used in treatment of menopause instead of hormone replacement therapy. In the current study we aimed to investigate effects of melatonin on NMDA receptors and oxidative stress values in ovariectomized rats.

Materials and methods: Thirty two rats were randomly divided into three groups. First group was used as ovariectomized plus melatonin (n=11) and the group received intraperitoneally (i.p) melatonin (daily and 10 mg/kg body weight) after induction of menopause. Ovariectomized rats were used in second group (n=11). Third group was used as control (n=10). 0.12 ml physiological saline was i.p. administered to the second and third groups. End of the 30 days brain samples were taken. Hippocampus NMDA receptors and brain cortex oxidative stress values were measured.

Results: Body weight gain was significantly ($p<0.05$) higher in melatonin group than in control. Lipid peroxidation value as MDA was significantly ($p<0.05$) higher in ovariectomized group than in control whereas its level was significantly ($p<0.05$) lower in melatonin group than in ovariectomized group. NMDA receptors as NR2B and reduced glutathione (GSH) levels in ovariectomized group was significantly ($p<0.05$) lower than in control group although their levels were significantly ($p<0.05$) higher in ovariectomized plus melatonin group than in ovariectomized group. Glutathione peroxidase activity did not change in the groups significantly.

Conclusion: We observed that melatonin induced protective effects on NMDA receptors and oxidative stress in ovariectomized rats.

Key Words: Menopause, Melatonin, Oxidative stress.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Menopoz kadın hayatının östrojen eksikliği ile seyreden belirli bir dönemi olup, bu dönemde östrojen eksikliğine bağlı olarak beyindeki kognitif fonksiyonlarda bozulmalar baş göstermektedir. Östrojenler hipokampal öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını arttırmaktadırlar. Östrojenin beyinde N-Methyl D-Aspartat (NMDA) reseptörleri üzerinde olumlu etkileri bilinmektedir (1). Karanlıkta bırakılan ratlarda hipokampusta NMDA reseptörlerinde artış olduğu gösterilmiştir (2). Östrojen'in aromatik yapısından dolayı antioksidan özelliğinin varlığı bilinmektedir ve menopozda östrojen eksikliğine bağlı olarak beyinde serbest oksijen radikal üretimi artmaktadır. Hafıza ve öğrenme fonksiyonları bu artış neticesinde bozulmaktadır. Serbest oksijen radikalleri (superoksit, hidrojen peroksit vb) fizyolojik olarak vücutta üretilmektedirler, fakat kontrol altında tutulmazlar ise hücrelerin lipid, protein ve nükleik asit yapılarına zarar vermektedirler.

Antioksidanlar enzimatik ve non enzimatik olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Non enzimatik antioksidanlar içerisinde pineal bezden salgılanan melatonin önemli bir yer tutmaktadır. Melatonin(5-methoxy-N-acetyl-tryptamine)'in bazı araştırmalarda E vitamininden daha kuvvetli bir antioksidan olduğuna dair bildirimler mevcuttur (3). Hormon Replasman Tedavisi (HRT) verilen cerrahi menopozlu kişilerde antioksidan sistem desteklenmiştir (4). Fakat menopozdaki kadınlar ilaç özelliğinden dolayı HRT kullanmak istememektedirler. Ayrıca, HRT kullanımının kanser yapıcı etkisinin varlığına dair bildirimler artmaktadır. Bunun yerine vitamin benzeri antioksidan özelliğe sahip olan melatonin kullanımı hem tercih edilebilir ve hem de daha kuvvetli etki elde edilebilir.

Bu çalışmada amacımız cerrahi menopoz yapılarak östrojen eksikliği oluşturulan dişi ratlarda beyinde serbest oksijen radikallerindeki değişiklikleri ve yine eksikliğe bağlı olarak NMDA reseptör düzeylerindeki değişiklikleri saptamak ve melatoninin NMDA reseptörleri üzerine olan etkisinden ve antioksidan özelliğinden yararlanarak bu değişimler üzerine herhangi bir etkisi olup olmadığını araştırmaktır. Bu çalışma sonucunda antioksidanlardan melatoninin belki de klinik uygulamada Hormon Replasman tedavisine bir alternatif olabileceği hipotezini hedefleyerek çalışmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Menopoz

2.1.1. Menopoz'un Tanımı

Menopoz, overdeki folliküler inaktivite sonucunda menstrüasyonların kalıcı olarak kaybıdır. Menopoz 12 aylık amenoreyi takiben son görülmüş olan menstrüasyon şeklinde de tanımlanmaktadır (5).Kadın hayatının dönüm noktasıdır. Yunanca men(ay) ve pausis (duraklama) kelimelerinden oluşan menopoz sözcüğü ‘son adet’ anlamına gelmektedir. Her ne kadar kelime olarak son adet anlamına gelse de bu geçiş keskin sınırlı olmayıp yıllar süren uzun bir süreci kapsamaktadır.

Kendiliğinden oluşan menopoza Doğal Menopoz ya da Fizyolojik Menopoz, overlerin çıkarılması sonucu oluşan menopoza Cerrahi Menopoz denir. Menopoz radyasyon veya kemoterapi sonucu da oluşabilir (İatrojenik Menopoz). 40 yaş altında olduğunda Prematür Menopoz adını alır. Menopoz, genelde KLİMAKTERİUM diye adlandırılan, kadın yaşamının reproduktif çağı ile yaşlılık dönemi arasında yer alan 40 ile 65 yaşları arasındaki süreyi kapsayan dönemde, bir kilometre taşıdır. DSÖ klasifikasyonuna göre Klimakterium:

1. Premenopoz: İlk menopoz semptomlarının görüldüğü klimakterium başlangıcından, son adet zamanına kadar devam eder. Genelde premenopoz 40 yaşlarında başlar.
2. Menopoz: Son adet kanamasını ifade eder.
3. Postmenopoz: Menopozun fizyolojik ya da iatrojenik olmasından bağımsız olarak son adet dönemi sonrasındaki süreçtir. Bu tanım için 12 aylık amenore döneminin gözlenmesi gerekmektedir.

Yaklaşmakta olan menopozun ilk klinik, biyolojik ve endokrinolojik belirtilerinin (örneğin: vasomotor semptomlar, menstrüel düzensizlik) başladığı dönemden itibaren son adetten 12 ay sonrasına kadarki döneme perimenopoz denir. 5 yıl veya daha fazla sürebilir. Perimenopozda over fonksiyonlarının azalması, ovulasyonun azalması, östradiol üretiminde belirgin azalma ve androjen üretiminde orta

dereceli azalma olur (6). Perimenopozal geçişi objektif olarak tanımlamak için elimizdeki mevcut olan tek belirteç menstüel düzensizliktir.

Dünya genelinde ortalama bir menopoza yaşı belirlemek her ne kadar güç olsa da ortalama menopoza yaşı 51 olarak kabul edilmekte olup, bu yaş sınırları 43-57 arasında değişmektedir. Türk kadınlarında ortalama menopoza yaşı 46-48 olarak bildirilmiştir (7). Menopoza yaşını etkileyen birçok faktör araştırılmış ve tanımlanmıştır.

Menopoza yaşının belirlenmesinde, beslenme, yüksek irtifalarda yaşama, menarş yaşı ve parite önemli rol oynar. Erken menarş olanlarda geç menopoza beklenmektedir. Yüksek rakımda yaşamak geç menopoza rol alırken alkol tüketimi ve dominant el olarak sol el kullanımı erken menopoza ilişkilidir (8,9,10). İçilen sigara sayısı ve süresiyle ilişkili olarak menopoza yaşının bir buçuk yıl daha erken olabileceği gösterilmiştir (11). Vücuttaki yağ kütesinin östrojene katkısından dolayı zayıf kadınlarda daha erken menopoza olasıdır (12).

2.1.2. Menopozal Yakınmalar

2.1.2.1. Nörovejetatif Semptomlar

Östrojen hormonu birçok organ ve dokunun gelişiminde rol oynadığı gibi santral sinir sisteminin organizasyonu ve gelişiminde de kalıcı etkilere sahiptir. Otoradyolojik çalışmalar ile; hipofiz, hipotalamus, limbik ön beyin ve serebral korteksin bazı lokalizasyonlarında östrojen özel nükleer reseptörlerinin varlığı ortaya konmuştur. Östrojenler beyin biyokimyasını, serotonin gibi bir çok nörotransmitter aminlerin konsantrasyonlarını değiştirerek etkilemektedir. Limbik sistem fonksiyonları da başta duygusal sistem olmak üzere büyük oranda östrojen tarafından yönlendirilmektedir. Östrojenin uyarıcı etkisine karşın progesteronun kuvvetli anestetik etkisi vardır (13-15).

Menopoza döneminde santral sinir sisteminde oluşan değişikler başlıca aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir;

- Uyku Bozuklukları
- Sıcak basmaları
- Depresyon ve Moral değişiklikleri
- Hafıza bozuklukları ve Alzheimer hastalığı

Sıcak Basmaları

Sıcak basması olarak adlandırılan vazomotor belirtiler, ciltte ısı artışı ve vazodilatasyon ile başlayan bir süreçtir. Toplumlara göre prevalansı farklılıklar göstermekle beraber menopozal yakınmalar arasında en sık rastlanılan ve rahatsız eden semptomdur. Sıcak basması ve terleme kadınların % 75-85'i tarafından yaşam kalitelerini azaltan olaylar olarak ifade edilmektedir. Vazomotor semptomlar over aktivitesinin azalması ve östrojen eksikliğiyle yakından ilgilidir. Sıcak basmalarının ooferektomi ve postpartum dönemi takiben hemen başlaması östrojen yetersizliğiyle bağlantısını net olarak ortaya koymaktadır. Östrojen replasman tedavisi uygulanan kadınlarda FSH ve LH menopozal seviyede kalmasına rağmen sıcak basmaları hafiflemiştir. Progesteronların sıcak basması üzerine olumsuz veya arttırıcı etkisi yoktur (16).

Menopozun erken döneminde başlayan sıcak basmaları; kişiler arası, frekans, süre ve yoğunluk açısından farklılıklar göstermekle birlikte kendiliğinden sonlanmaktadır (13,17).

Sıcak basması, karakteristik olarak baş ve yüzde sıcaklık hissi olarak başlayarak boyun ve vücudun diğer taraflarına yayılmaktadır. Her episod ortalama 2.7 dk sürmekle birlikte, 1 ila 6 dk arasında devam edebilmektedir. Sıcak basması episodları, vücut sıcaklığında ve nabız sayısında artma ile beraber ellerde kan akımının hızlanmasını takiben sıcaklığın düşmesi ve terleme ile sonuçlanır. Cilt ısı ortalama olarak 0,1 ila 0,7 derece, kalp atımı ise 4-35 atım/dk artmaktadır (17,18). Feldman ve arkadaşları, sıcak basmalarının % 64 kadında 1-5 yıl sürdüğünü, % 26 kadında 6-10 yıl ve %10'unda ise 11 yıldan fazla sürdüğünü saptamışlardır (14).

Over fonksiyonlarındaki azalma ve östrojen eksikliğiyle yakından ilgili olan sıcak basmalarının, cerrahi menopozda daha sık ve şiddetli yaşandığı gerçeği pek çok çalışmanın ortak sonucudur (18,19). Ooferektomi ameliyatı sonrasında deri sıcaklığında meydana gelen değişimleri saptamak amacıyla fareler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, ooferektomi sonrası farelerin vücut ısılarının 28.4 ± 0.33 derece, kontrol grubundaki farelerin ise 27.0 ± 0.2 derece olduğu ve gruplar arası ısı farkının istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.0035$) olduğu saptanmıştır (20).

Sıcak basması esnasında abdominal arter ve karotisteki nabız artışını saptamak amacıyla ooferektomi ameliyatı olan ve olmayan koyunlar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, deney grubundaki koyunların %63'ünde karotis arter nabız artışına, %32'sinde ise abdominal arter nabız artışına rastlanmış olup, bu değerler kontrol grubunda sırası ile %37 ve %17'dir ve gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$) (21).

Uyku Bozuklukları

Uyku, canlıların temel biyolojik işlevlerinden biridir. Postmenopozal kadınlarda, hypoöstrojenemiye bağlı REM uykusunun azalması, sıcak basması ve gece terlemesi şikâyetlerinin artması uyku bozukluklarına sebebiyet vermektedir. Bunlara paralel oluşan uyku bozuklukları ve uyku kesintileri postmenopozal kadında irritabilite, sinirlilik, halsizlik, unutkanlık ve konsantrasyon bozukluklarına yol açmaktadır (17,14).

Kim ve Lee tarafından (2005) histerektomi sonrası görülen şikâyetleri saptamaya yönelik yapılan çalışmada; yorgunluk, depresyon, anksiyete, ağrı ve uyku bozuklukları sık görülen yakınmalar olarak belirlenmiştir. Kadınların cerrahi menopoza sürecinde uyku süresinin ve kalitesinin azaldığı, bu durumun da kadını fiziksel, sosyal ve psikolojik yönden olumsuz etkilediği saptanmıştır (22).

Depresyon ve Moral Değişikleri

Menopoz kadının bedenini ve beynini dramatik şekilde etkileyen, fiziksel ve emosyonel dengenin bozulmasına yol açan bir olaydır (17,18). Mc Donald, menopozun kimi kadınlar için çocuk doğurma rüyasının son bulduğu ve östrojen azalması sonucu sağlıkla ilgili risklerin arttığı, kimileri için de menstruel sıkıntılarının artık yaşanmayacağı, dismonerenin olmayacağı ve istenmeyen gebeliklerden korkmanın gerekmediği bir zaman dilimi olarak görüldüğünü belirtmektedir (23).

Yaşamlarının bu safhasında çoğu kadının evde statü kaybettiği, bu durumun çocukların evden ayrılmasıyla, çocuk doğurma ve yetiştirmenin sonlanmasıyla ortaya çıktığı belirlenmiştir. Deykin'in, "Boş Yuva Sendromu" olarak adlandırdığı bu ayrılık, uyum sorunlarına neden olmaktadır. Deeks ve arkadaşları, ev dışında bir işte çalışan veya sosyal aktivitelerde bulunan kadınların klimakterik dönemde yaşadıkları problemleri daha kolay atlattıklarını öne sürmüştür (24).

Bir grup Türk kadınının menopozla ilgili duygu ve düşüncelerini tanımlamak amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada ise kadınların % 85.7'sinin menopozu ruhsal sıkıntı yaratan bir olay olarak tanımladıkları ve %65.7'sinin sinirlilik yaptığını ifade ettikleri saptanmıştır (25).

Depresyon ve moral değişiklikleri, her ne kadar sosyal ve aile problemlerine indeksli olsa da, çift körleme ile yapılan çalışmalarda östrojen eksikliğine paralel olduğu ve östrojen tedavisiyle önemli ölçüde iyileşme olduğu saptanmıştır (13,26). Östrojen eksikliği depresyon oluşmasında biyokimyasal bir taban oluşturmaktadır. Serotonin metabolizmasında rol oynayan triptofan seviyesi östrojen seviyesinin eksikliğine paralel azalmakta ve depresyona zemin hazırlanmaktadır (13,26).

Hafıza Bozuklukları ve Alzheimer Hastalığı

Birçok kanıt östrojenin, sinaptogenezin modülasyonu, serebral kan akım artışı, apoptozise karşı koruma ve antioksidan özellikleri dahil önemli bir nöromodülatuar ve nöro-koruyucu rol oynadığını düşündürür. Bunlar östrojen replasman tedavisinin (ERT) sağlıklı kadınlarda kognitif yaşlanmaya karşı koruculuğu olacağı hipotezini destekler; östrojen Alzheimer hastalığı ile ilişkili kognitif kaybın muhtemel bir tedavisi olabilir (14). Kadınlarda östrojenin randomize ve kontrollü çalışmaları bu hormonun postmenopozal kadınlarda özellikle verbal (sözlü) hafızayı koruduğunu gösterir. Bununla birlikte muhtemel Alzheimer tanısı almış kadınlar üzerinde yapılan kontrollü tedavi çalışmalarından elde edilen son bulgular fizyolojik ERT dozlarının kognitif fonksiyondaki var olan defisiti düzelttiğini ve hafızada ileri kayıpları önlediğini göstermiştir (14).

Yine en sık kabul gören teorilerden birine göre, beyinde asetilkolinin azalması bellek disfonksiyonlarından ve Alzheimer hastalığındaki hafıza kaybından sorumlu tutulmaktadır (13,14). Dişi Sprague-Dawley ratlarında overektomi progresif hafıza kayıpları, santral kolinerjik sinir sistemi dejenerasyonu ve diferensiasyon/apoptozis imbalansı ile karakterizedir. Bu model kadınlardaki postmenopozal patofizyolojik değişiklikleri taklit etmek için yaygın olarak kullanılmış bir in vivo model olmuştur (14). Overektomi tipik olarak öğrenme/hafıza davranışının bir östrojen-dönüşümlü bozukluğu ile ilişkilidir. Bununla birlikte melatonin ve E2-tedavili ratlar, su labirenti ile yapılan çalışmada, overektominin neden olduğu öğrenme ve hafıza defisitlerinde

azalma göstermiştir, ki bu, overektomize ratlarda uzun süreli melatonin veya E2 tedavisinin bozulmuş öğrenme ve hafızayı önlediği hipotezini destekler. Tedavi verilmeyen overektomize ratlarda çalışmanın dört ve beşinci günlerinde dahi bir performans artışı görülmemiştir (14).

Östrojen, asetiltransferaz enziminin aktivitesini özellikle hippokampus, bazal ön beyin ve frontal kortekste arttırmakta böylece hafıza ve öğrenme fonksiyonlarında olumlu değişikliklere yol açmaktadır (13,14). Uzun süre östrojen kullanan ve kullanmayan kadınlar üzerinde yapılan çalışmalarda, östrojen grubunda bellek skorları anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (27).

2.1.2.2. Kardiyolojik Değişiklikler

Kardivasküler hastalıklar kadınlarda daha az görülmesine rağmen, her iki cinsiyette de en sık görülen ölüm nedenleri arasında ilk sırayı almaktadır. Son verilere göre, her dört kadından biri koroner kalp hastalıklarından ölmektedir. Özellikle 1970' li yıllardan sonra yapılan çalışmalarda; 55-65 yaş arası kadınların % 36' sının kalp hastası olduğu saptanmıştır. Nitekim bu dönemde kardiovasküler hastalıklardan ölüm, her türlü kanser, diyabet, serebrovasküler hastalık ve kaza sonucu ölümlerin toplamından daha fazla sayıda yer tutmaktadır. Koroner hastalık açısından daha erken yaşlarda erkek/kadın oranı 2.5/1' e kadar yükselmekte, ölüm oranı ise özellikle 35-44 yaş grubu erkeklerde kadınlara göre altı kat daha fazla olmaktadır. Fakat postmenopozal dönemde ve ortalama yedinci dekatta oran eşitlenmektedir. Bu olaydaki temel sorumlunun östrojen düzeyindeki azalma ve androjen potansiyelindeki rölatif artış olduğu ileri sürülmektedir (18,28).

Menopoz, kardiyovasküler sistem açısından kesin bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Genç yaşta cerrahi menopoz olanlarda risk belirgin olarak yükselir ve östrojen resplasman tedavisi uygulandığı taktirde risk belirgin olarak azalır (28).

Östrojen, vasküler hastalıkların gelişiminde rol oynayan şu faktörler üzerinde etkilidir:

1-Serum lipid konsantrasyonları: Kardiovasküler sistem açısından, yüksek dansiteli lipoproteinlerin koruyucu rolü olduğu, düşük dansiteli lipoproteinlerin ise hastalık riskini arttırdığı belirtilmektedir. Menopozdan önce kadınlarda yüksek dansiteli

lipoprotein düzeyi, östrojen varlığına bağlı olarak yüksek olduğundan kardiovasküler hastalık geçirme riski azalmaktadır. Östrojenin en iyi bilinen ve gözlenebilir etkisi, büyük oranda karaciğerde apoprotein genlerinin östrojen-reseptör kompleksi ile uyarılması sonucu lipid profili üzerinden ortaya çıkar.

2-Koagulasyon ve fibrinolitik sistemler,

3-Antioksidan sistemler,

4-Nitrit oksit ve prostaglandinler gibi vazoaktif molekül üretimi (28).

Östrojen damar dilatasyonunu sağlayarak damarlarda daralma ve tıkanıklık oluşumunu azaltmaktadır.(29).

Doğal ve cerrahi menopozda serum lipid ve lipoprotein düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmada, doğal ve cerrahi menopoz tipleri arasında, HDL kolesterol ve LDL kolesterol yönünden anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır (sırasıyla $p=0.021$ ve $p=0.048$) (30).

2.1.2.3. Deri Değişiklikleri

Deride incelme, kuruluk ve kırıklılık oluşması deri yaşlanmasının belirtileridir. Menopozda deri gevşektir ve fonksiyonları azalmıştır (13,17,31). Menopoza spesifik yapısal deri değişiklikleri söz konusu değildir. Fakat deride, derinin östrojen için hedef organ olduğunu düşündüren östrojen reseptörleri mevcuttur. Östrojen reseptörlerinin en yoğun rastlandığı yer yüz derisidir (17, 31).

Yaşlanma ile deri ve deri eklerinde ortaya çıkan belirgin değişimde, menopoz sonrası oluşan östrojen eksikliğinin de belli bir rolü vardır. Ancak bu değişimlerin kronolojik yaşlanma, foto yaşlanma veya menopoz nedeniyle mi olduğunu ayırt etmek zordur. Bazı deneysel çalışmalarda östrojenin, derinin su, fibroblast aktivitesi, hyaluronik asit ve dermal kollogen içeriğini artırdığı gösterilmiştir (31).

Postmenopozal dönemde yapılan pek çok çalışmada, kadınların deri kalınlıklarının ve kollojen düzeylerinin her yıl ortalama %1-2 oranında azaldığı belirlenmiştir. 3875 postmenopozal kadın üzerinde deri değişikliklerini saptamak amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, %36.2 olguda senil deri kuruluğu, %28.2 olguda deri kırıklığı ve %16.2 olguda deri atrofisi saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda

östrojen tedavisi ile deri kalınlığının ve deri nem oranının arttırıldığı belirlenmiştir (31). Creidi ve arkadaşları tarafından yapılan randomize, çift kör bir çalışmada konjuge equine östrojen krem veya plasebo kremin 24 hafta süre ile her gece uygulandığı hasta gruplarında deri kalınlıkları ölçülmüş ve konjuge equine östrojen krem kullananlarda deri kalınlığındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ileri sürülmüştür (27).

Postmenopozal dönemde deride ayrıca ateş basmaları, keratoderma klimekterium(ayak tabanı ve avuç içlerinde derinin sertleşmesi) ve postmenopozal pruritus görülmektedir. (20).

Prematüre östrojen defekti saptanan genç kadınlarda, dermal elastik liflerin degenerasyonunda hızlanma kaydedilmiştir (32).

Postmenopozal cilt değişiklikleri ile ilgili 18 fare üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, çalışma grubunda yer alan dokuz fareye ooferektomi yapılmış, diğer dokuzu da kontrol grubunu oluşturmuştur. Operasyondan üç ay sonra yapılan ölçümlerde, deney grubunda yer alan farelerin cilt kırışıklarının arttığı, kalınlığının ise kontrol grubundaki vakalara göre azaldığı saptanmıştır (33). Deride östrojen reseptörlerinin varlığı ve doğal menopozda yıllık %1-2 olan deri incelmesinin cerrahi menopozda %6-10 olduğu düşünüldüğünde, cerrahi menopoz deri yaşlanması açısından büyük risk taşımaktadır (34).

2.1.2.4. Saç ve Kılınma Değişiklikleri

Vücut kıllarının karakteristik dağılımı, deri altı yağ dokusu ve kadın derisinin fizik yapısı östrojen ve androjen arasındaki dengelere bağlıdır (13,23). Östrojen seviyesinin azalması ve adrenokortikal aktivitenin artması ile çene, dudak üstü, göğüs ve karında kalın tüylerin çıkmasına eğilim artmakta, buna karşılık saçlar, koltukaltı ve pubis kılları seyrekleşmektedir (13,23).

2.1.2.5. Ürogenital Sistem Değişiklikleri

Östrojen ve progesteron reseptörlerinin vajen, üretra, mesane ve pelvik tabanı oluşturan kas ve fasyaların yapısında bulunduğu bilinmektedir (17). Menopoz ile birlikte over fonksiyonlarının bozulmasına bağlı olarak ürogenital sistemde meydana gelen atrofi menopozun erken dönemlerinde başlar. Ancak ürogenital östrojen

yetmezliği sendromunun semptom ve işaretleri, hemen atrofi başlar başlamaz değil ileri dnemelerde yaşlanmayla ortaya çıkmaktadır (17).

Vagina dokusunda başlayan atrofi sonucunda mukoza inceler, düzleşir, gevşer ve direnci azalır; vajina daralır ve kısalır, vajinal kayganlaşmada gecikme ve azalma olur. Üretra epitelini ile vagina epitelini ortak embriyolojik orijine sahip olduğundan steroid hormonlardan benzer şekilde etkilenirler. Yaş ve östrojen eksikliğinden kaynaklanan bağ dokusunda kollagen yapımındaki değişiklikler, üretral gevşeme, üriner inkontinans ve pelvik organ prolapsusları ile sonuçlanmaktadır (13).

Vagina zengin östrojen reseptörleri ile kaplı olduğundan, östrojen seviyesi azalırken, vaginal epitel kalınlığı ve hücrelerdeki glikojen miktarı da azalır; bu durumda vajen pH'sı artar. Buna bağlı olarak vajinanın biyolojik savunma sistemi zayıflar, flora değişir ve vagina enfeksiyonlara karşı eğilimli hale gelir. Böylece menopozal kadın, vaginal kuruluk, yanma, iritasyon, akıntı gibi şikâyetler tarifleyebilir (13).

Özellikle hormon takviyesi görmemiş ve cerrahi yolla menopoza giren kadınlarda, dış genital bölgenin semptomsuz ve yavaş ilerleyen atrofik değişikliği senil vulvar atrofi olarak tanımlanmaktadır. Senil vulvar atrofi, labia minörler, klitoris ve labia majörlerin i yüzeilerini ilgilendiren regresif değişiklikler ile birlikte belirli bir ölçüde büzüşme ile karakterizedir. Kaşıntı hafif derecededir, vajen ve çevresindeki mukozal alan kurudur (13). Uterus, serviks, tuba ve overler de atrofik değişiklerden etkilenir. Bu organları yerinde tutan ligamentler, fasya ve kaslardan oluşan destek dokularında, tonüs ve turgor kaybı yaşanabilir (13).

2.1.2.6. Cinsel Yaşam Değişiklikleri

Yaşlanma ve menopoz toplumlara ve költürlere göre değişmekle birlikte çoğu zaman seksüel hayatın sonu gibi algılanır. Oysa seksüalite; biyolojik, psikolojik ve fizyolojik komponentleri bulunan kompleks bir olaydır. Menopoz, bu komponentleri genellikle olumsuz yönde etkilemesine karşın, toplumsal ve bireysel bazı düşünceler, gerçekte meydana gelebilecek disfonksiyonların farklı algılanmasına sebebiyet verebilir (18). Postmenopozal kadınlarda, menopozal dönemde cinsel ilgi kaybı, orgazma ulaşmada zorluk, klitoral uyarıda ve cinsel ilişki sayısında azalma, disparoni insidansında artma sık rastlanılan seksüel şikâyetlerdir (18). Menopozal dönemde

östrojen azalması, kadının iyilik halini olumsuz etkilemekte ve psikolojik durumda kayıplara neden olmaktadır. Bu değişimler kadının, cinsel kimliğinin zarar görmesine yol açmakta ve seksüel davranışlarını etkilemektedir (25). Yapılan çalışmalarda, östrojen azalmasının erotik uyarılara cevaptan ziyade vajinal kuruluk ve disporani sebebiyle seksüel hazzı etkilediği ileri sürülmektedir (25). Östrojen azalmasına bağlı, atrofi, yanma, kuruluk, pH' ın yükselmesi ve floranın bozulması gibi ürogenital değişiklikler sonucu ortaya çıkan akıntı, infeksiyon, disporani dolayısıyla kadın cinsel ilişkiden uzaklaşabilmektedir.

Östrojenin bir diğer etkisi de, damarlar üzerinedir ve bu durum, vajinal ve klitoral dolaşımın bozulmasına yol açarak, vajinal lubrikasyon ve cinsel hazzın uyarılmasını olumsuz yönde etkilemektedir. Östrojen eksikliğine bağlı arteroskleroz, klitoral ereksiyon yetersizliğine neden olmaktadır. (25).

Postmenopozal dönemde azalan diğer bir hormon da androjendir. Androjen düzeyindeki azalmanın, libido ve seksüel fonksiyonların kaybına, dolayısıyla da seksüel fantezilerin sayısında azalmaya yol açtığı bildirilmiştir.

2.1.2.7. Osteoporoz

Osteoporoz; düşük kemik kütlesi ve kemik mikro mimarisinde bozulma ve buna bağlı olarak kemiklerde kırılabilirliğin artması, genellikle omurga, radius ve kalçada olmak üzere fraktür riskinin yükselmesi ile tanımlanan bir hastalık olarak kabul edilmektedir (13,35,36). Osteoporoz artan fraktür hızı ile ileri yaşlarda kadınlarda önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasındadır. Osteoporozda, hormonal dengenin yanı sıra; ileri yaş, genetik faktörler, fiziksel aktivite, beslenme şekli, sigara ve alkol kullanımı gibi faktörler de etkilidir.

Özellikle seks hormonlarından yoksun yaşanan postmenopozal yıllarda her 10 yıl için %10-15 kemik kütlesi kaybedilir (37).

Östrojenin ve diğer seks hormonlarının, iskeletin büyüme ve matürasyonu sürecine çok önemli etkileri vardır. Bu hormonlar, pubertede büyümenin ani hızlanmasını düzenler ve puberte sonrası epifizyal büyüme plaklarının kapanmasını sağlayarak uzun kemiklerin büyümesini sonlandırmada etkili olurlar. Yetişkin kadınlarda östrojenin trabüküler kemiğin yeniden yapılanmasında gerekli olan bir tonik

supresyonu sağlayarak ve osteoblast, osteoklast arasındaki dengeyi koruyarak kemik kütlesinin devamlılığında önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir (13,35,38). Progesteronun da, kemik yapımı üzerine uyarıcı etkisi vardır, ancak bu etkinin gücünün östrojen varlığıyla ortaya çıktığı bir gerçektir (33,38).

Paratiroid hormonu (PTH), kalsiyumun en önemli düzenleyicisidir ve kemik dokusu üzerine birden fazla etkisi vardır. Östrojenin eksikliğinin, kalsiyum dengesini ayarlayan PTH, kalsitonin gibi hormonları olumsuz etkilediği bilinmektedir (33,38).

Menopoz sonrası kemik kaybının hızlandığı, erken veya cerrahi menopozun osteoporoz sürecini hızlandırıp öne aldığı bilinen bir gerçektir (33,38). Cerrahi menopozda, tüm bu hormonal değişikliklerin daha kısa sürede ve daha şiddetli yaşanması kemik dokusunun doğal menopoza göre daha olumsuz etkilenmesine sebebiyet vermektedir.

Afrikalı ve Amerikalı kadınlarda osteoporozla yönelik risk faktörlerini saptamak amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, kadınlarda geçirilmiş ooferektomi ameliyatının osteoporoz riskini arttırdığı ($p < 0.03$) saptanmıştır (39).

Menopoz tiplerinin kemik dokusuna olan etkisini saptamak amacıyla doğal, cerrahi, erken ve radyoterapi sonrası menopoza giren kadınlar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada; doğal yolla menopoza giren kadınlarda, osteopeni %45, osteoporoz %8, cerrahi yolla menopoza giren kadınlarda osteopeni %42 osteoporoz %14, erken menopoza giren kadınlarda osteopeni %42, osteoporoz % 12, radyoterapi sonrası menopoza giren kadınlarda osteopeni %75 osteoporozda %25 oranında saptanmıştır. Araştırmacılar, osteopeni ve osteoporoz bakımından erken menopoz ile cerrahi menopoz arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını belirtmiş, ortaya çıkan sonucun erken yaşta over fonksiyonlarından yoksun kalma ile ilgili olduğunu vurgulamışlardır (40).

Garcia ve ark'ları (2003) tarafından, cerrahi menopozdaki kadınlarda PTH seviyesi ve kemik yoğunluğu ilişkisini saptamak için gerçekleştirdikleri çalışmada, cerrahi yolla menopoza giren kadınlarda kontrol grubunda yer alan kendi yaş grubu kadınlara göre PTH seviyeleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.05$), (33).

2.2. Serbest Radikaller

2.2.1. Serbest Radikallerin Tanımı ve Oluşumu

Atomlar, nötron ve protondan oluşan bir çekirdek ve bu çekirdeğin çevresinde dönen elektronlardan oluşurlar. Her türden kimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Atom çekirdeğinin çevresindeki, elektronların bulunduğu boşluğa orbital denir. Her bir orbitalde spinleri birbirine zıt ($\uparrow\downarrow$) olan iki elektron bulunur. Bu elektronlara eşleşmiş veya ortaklanmış elektronlar denir (41).

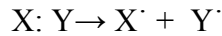
Atom veya moleküller, yörüngelerindeki elektronlar eşleşmiş ve ters pozisyonda yer aldıklarında kararlı bir yapı gösterirler. Bu kararlı yapı eşleşmemiş elektron bulundukları zaman bozulur.

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. (41,42).

Serbest radikaller başlıca üç yolla meydana gelirler (42):

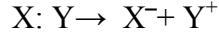
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birinin kalarak hemolitik bölünmesi:

Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır ise, her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron kalır. Sonuç olarak, iki adet reaktivite düzeyi yüksek serbest radikal oluşur.



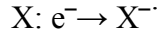
2. Normal bir molekülden bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi:

Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Askorbik asit, glutatyon (GSH) ve tokoferoller gibi hücresel antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.



3. Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi yoluyla:

Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olur. O₂'in tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksit (O₂^{-·}) oluşumuna neden olur.



Bu tepkimelerden herhangi biri oluştuğunda, radikal olmayan türler radikal haline gelir. Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucu, tepkimeye giren moleküller sıra ile serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayılır.

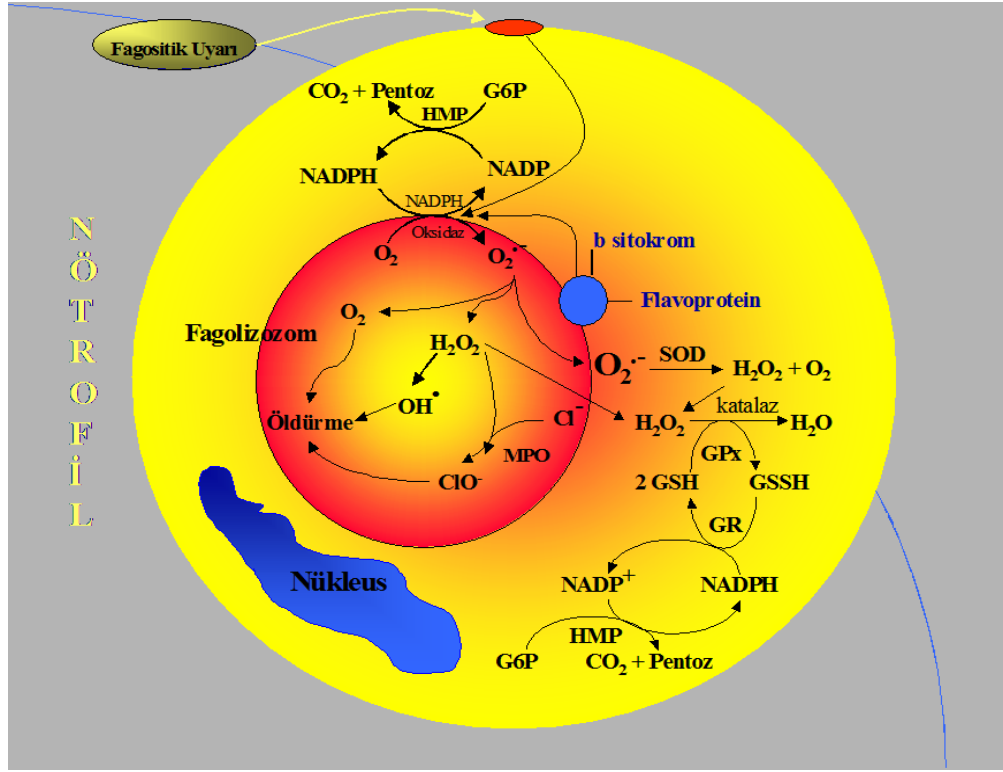
2.2.2. Serbest Radikal Kaynakları

Oksijen ve nitrojen molekülleri serbest radikal kaynaklarıdır. Serbest radikal oluşumu metabolik olayların seyri esnasında meydana geldiği gibi, organizmanın dış etkenlere maruz kalmasıyla da oluşabilir. Bu nedenle serbest radikal kaynakları, endojen ve ekzojen olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (44) (Tablo 1).

Tablo 1. Serbest radikallerin endojen ve ekzojen kaynakları

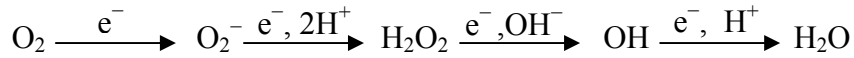
ENDOJEN KAYNAKLAR	
Mitokondrial elektron transport zinciri	
Mikrozomal elektron transport zinciri	
Oksidan enzimler	
	1. ksantin oksidaz
	2. indolamin dioksijenaz
	3. triptofan dioksijenaz
	4. siklooksijenaz
	5. lipooksijenaz
	6. monoaminooksidaz
fagositik hücreler	
	1. nötrofiler
	2. monosit ve makrofajlar
	3. eozinofiller
	4. endotelyal hücreler
otooksidasyon reaksiyonları	
EKZOJEN KAYNAKLAR	
Diyetsel:	
	1. doymamış yağ asitleri ve hayvansal proteinler bakımından zengin, sebze ve meyve bakımından fakir beslenme
	2. obezite
	3. aşırı demir ve bakır alımı
	4. gıdaların uygun olmayan koşullarda hazırlanması ve saklanması
	5. alkol
Çevresel	
	1. iyonize radyasyon
	2. hava kirliliği
	3. sigara
	4. asbest, pestisitler gibi kirleticiler
	5. güneş ışığı
	6. ısı şoku
	7. stres
İlaçlar:	
	1. antineoplastik ajanlar (adriamisin)
	2. glutasyon tüketen ilaçlar (asetaminofen)

1. ENDOJEN SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI:



Şekil 1. Endojen serbest radikallerin oluşumu

Elektron Transport Zinciri (ETZ): Mitokondri hücrede enerji üretimini ve hücre solunumu sağlar. Fizyolojik şartlarda ETZ ye giren oksijenin %1-3'ü süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)'e dönüşmektedir (44). Mitokondri iç zarında $O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumu ilk kez 1971 yılında Loschen ve Flohe (45) tarafından gösterilmiştir



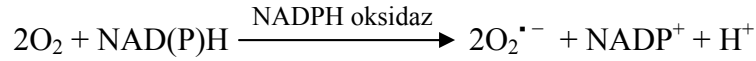
Sitokrom P 450 (CYP 450): Bu sistem, moleküllere bir elektron ilavesi ile veya molekülden bir elektron çıkararak toksik metabolitleri normal ürünlere çevirir. Bu oksidasyon redüksiyon olayları sırasında elektronlar O_2 'e akarak $O_2^{\cdot-}$ meydana getirebilir (46).

Araşidonik asit metabolizması: Mikrozoal ve plazma membranı tarafından radikal üretiminin önemli enzimleri olan lipooksijenaz ve siklooksijenaz aktivitesi, serbest oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranında araşidonik asit

salınımına yol açar. Araşidonik asitin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest ara ürünleri meydana gelmektedir (47).

Ksantin Oksidaz (XO): Bütün canlı türlerinde bulunan XO, pürinlerin hidroksilasyonunu katalizleyen bir enzimdir. Hipoksantin, oksijen varlığında XO ile ksantine oksitlenir; ksantin de aynı enzimle tekrar oksitlenerek ürik asidi oluşturur. Her iki adımda da O_2^- ve H_2O_2 radikalleri oluşur (48).

NADPH oksidaz: Özellikle fagosit ve lenfositlerde bulunan bu enzim mikroorganizmalara karşı önemli bir savunma elemanıdır ve plazma membranının dış yüzeyinde yerleşmiştir. Bir mikroorganizma ile karşılaşıldığında nötrofiller aktive olarak lizozomal içeriklerini dışarıya vermeye başlarlar. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ile birlikte mitokondri dışındaki oksijenin tüketiminde bir patlama gösterirler ve mikroorganizma yok edilir. Bu olaya “solunum patlaması” adı verilir ve bu olaydan sorumlu olan enzim NADPH oksidazdır (41,49).



Peroksizomlar: Yüksek miktarda oksidaz içerdiklerinden dolayı, çok önemli hücre içi H_2O_2 kaynağıdır. Ancak peroksizomlarda katalaz aktivitesi de çok yüksek olduğu için H_2O_2 'in zararlı etkisi kısmen ortadan kaldırılır (41,50).

Ayrıca askorbik asit, tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidrobiopterinler ve antibiyotikler gibi indirgenmiş elektron transferi yapan çözümlü hücresel bileşiklerin otooksidasyonu da O_2^- radikali oluşur (51).

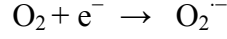
2. EKZOJEN SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI:

Çevresel, diyetel ve ilaçlar olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir. Ozon, azot dioksit, kükürt dioksit, hidrokarbonlar ayrıca asbest ile ksenobiyotikler önemli birer radikal kaynağı olabilmektedirler (48,53).

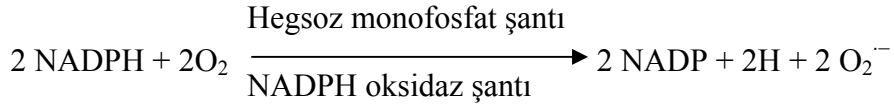
Fazla miktarda uzun süre alkol alımı ve sigara çeşitli radikallerin oluşmasına neden olmakta ve organizmanın antioksidan kapasitesini azaltmaktadır. Yüksek kalorili diyet özellikle mitokondri kaynaklı serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır (45,48,53).

2.2.3. Serbest Oksijen Radikalleri

1. SÜPEROKSİT RADİKALI: ($O_2^{\cdot-}$) Hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali, $O_2^{\cdot-}$ 'dir. $O_2^{\cdot-}$, kimyasal olarak oksijen molekülüne bir elektronun eklenmesi ile oluşur (51)



Bu reaksiyon, elektronların mitokondride solunum zincirlerindeki taşıyıcılardan sızması ve direkt olarak oksijene geçmesi ile meydana gelebilir. $O_2^{\cdot-}$ 'in en önemli kaynağı polimorfonüveli lökositler (PMNL) dir. PMNL'lerdeki üretim, membrana bağlı redükte NADPH oksidaz şantı veya heksoz monofosfat şantının bir sonucudur (51).



2. HİDROJEN PEROKSİT: (H_2O_2) $O_2^{\cdot-}$ 'in dismutasyonundan sonra NADPH oksidaz şantından PMNL'ler tarafından üretilir. Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin esas üretimi; $O_2^{\cdot-}$ 'in dismutasyonu ile olup, iki $O_2^{\cdot-}$ yapılarına iki hidrojen atomu alarak H_2O_2 ve O_2 oluştururlar. Bu reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) adı verilen enzim tarafından katalizlenir (42). H_2O_2 , birçok fizyolojik fonksiyonu olan zayıf bir oksidandır. Hücre membranları arasında serbest olarak diffüze olabilme yeteneği mevcuttur. H_2O_2 , fizyolojik pH ve ısıda, metal iyonları yokluğunda oldukça stabil olması yanında, özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek, yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur (51). Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında LPO gibi radikalleri başlatabilir. Bu reaksiyona Fenton Reaksiyonu adı verilir (52). Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz yerine getirir (51).

3. HİDROKSİL RADİKALI: (OH^{\cdot}): Bilinen en reaktif oksidandır. Yarılanma ömrü çok kısadır. Haber-Weiss reaksiyonu ile veya Fenton reaksiyonu ile H_2O_2 'ten meydana gelir (52).

4. HİPOKLORÖZ ASİT: (HOCl): Enzimatik olarak, nötrofiller tarafından üretilen, güçlü bir oksidandır. Fagositik hücrelerce bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Nötrofiller, makrofajlar ve eozinofiller HOCl'i üretirler. Özellikle H₂O₂ üzerine myeloperoksidaz'ın etkisi ile nötrofillerde oluşur. Hücre dışına salınan antibakteriyel bir ajandır. Ancak çok düşük konsantrasyonlarda bile belirli protein fonksiyonlarını bozabilme yeteneğindedir. Yüksek konsantrasyonlarda hücre lizisi oluşturabilir. Alfa1-antitripsini okside ve nötrofil kollajenazını aktive etme yeteneğinde olan HOCl, temizleyici antioksidanlar olan albümin ve askorbik asit ile uzaklaştırılır (53).

5. SİNGLET OKSİJEN: ¹O₂ gerçek bir radikal değildir ve eşleşmemiş elektron içermez. Diğer reaktif oksijen türleri ile karşılaştırıldığında oldukça zararsızdır. ¹O₂, oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünden ters yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi ile oluşabileceği gibi, O₂⁻'nin dismutasyonu ve H₂O₂'in HOCl ile reaksiyonu sonucunda da meydana gelebilir (54).

Tablo 2. Oksijenden oluşan toksik metabolitler

Süperoksit radikali (O ₂ ⁻)	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)
Hidroksil radikali (OH [·])	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Hidroperoksi radikali (HO ₂ [·])	Hipokloröz asit (HOCl)
Alkoksil radikali (LO [·])	Singlet oksijen (¹ O ₂)
Peroksi radikali (LOO [·])	Ozon (O ₃)
Tiyl radikali (RS [·])	Peroksinitrit (ONOO ⁻)
Nitrik oksit (NO)	

Serbest oksijen radikallerinin birçok organ ve sistemleri etkileyen pek çok hastalığın patogeneğinde etkili olduğu öne sürülmektedir (53) (Şekil 2).



Şekil 2. Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu klinik tablolar

2.2.4. Reaktif Nitrojen Radikalleri

Yapılarında +1 den +5 'e kadar değişen, farklı oksidasyon durumlarında nitrojen atomu bulunduran moleküllere reaktif nitrojen türleri denir (58) (Tablo-3).

Tablo 3. Reaktif nitrojen radikalleri

+1	Nitroksil Anyonu	NO^-
+2	Nitrik Oksit	NO
+3	Nitrozil Katyonu	NO^+
	Nitröz asit / Nitrit	$\text{HNO}_2 / \text{NO}_2^-$
	Peroksinitröz asit/	$\text{ONOOH} /$
	Peroksinitrit	ONOO^-
	Dinitrojen Trioksit	N_2O_3
	Nitrojen Dioksit	NO_2
+4	Dinitrojen Tetraoksit	N_2O_4
+5	Nitrik Asit / Nitrat	$\text{HNO}_3 / \text{NO}_3^-$
	Nitril Katyonu	NO_2^+

NİTRİK OKSİT: (NO): Nitrik oksit hem nöronal hem de endotelial patofizyolojide önemli rol oynamaktadır. NO, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, düz kas gevşemesi, vazodilatasyon ve nörotransmisyonu gibi birçok fizyolojik süreçte görev alan çok reaktif bir radikaldir (55, 56,57). Yarı ömrü 10-20 sn dir. Nitrik oksit sentaz (NOS) adı verilen enzim tarafından Largininin guanido nitrojeninden oluşmaktadır. Bu reaksiyonda O₂ ve NADPH gereklidir.

NOS enziminin iki ana formu vardır.

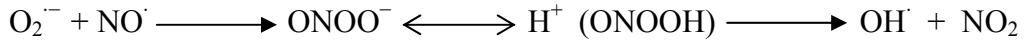
1-İndüklenebilen (iNOS)

2-Yapısal (cNOS).

Nöronal (nNOS)

Endotelyal (eNOS)

PEROKSİNİTRİT (ONOO⁻) : NO'nun O₂⁻ ile invivo reaksiyonu sonucunda oluşan sitotoksik bir türevidir (59). Hücrede SOD normalde oluşan tüm süperoksiti dismutasyona uğratmaya yetecek düzeydedir fakat, süperoksit düzeyi çok artmışsa ya da çok fazla NO radikali meydana gelmişse, peroksinitrit oluşur (60,61).

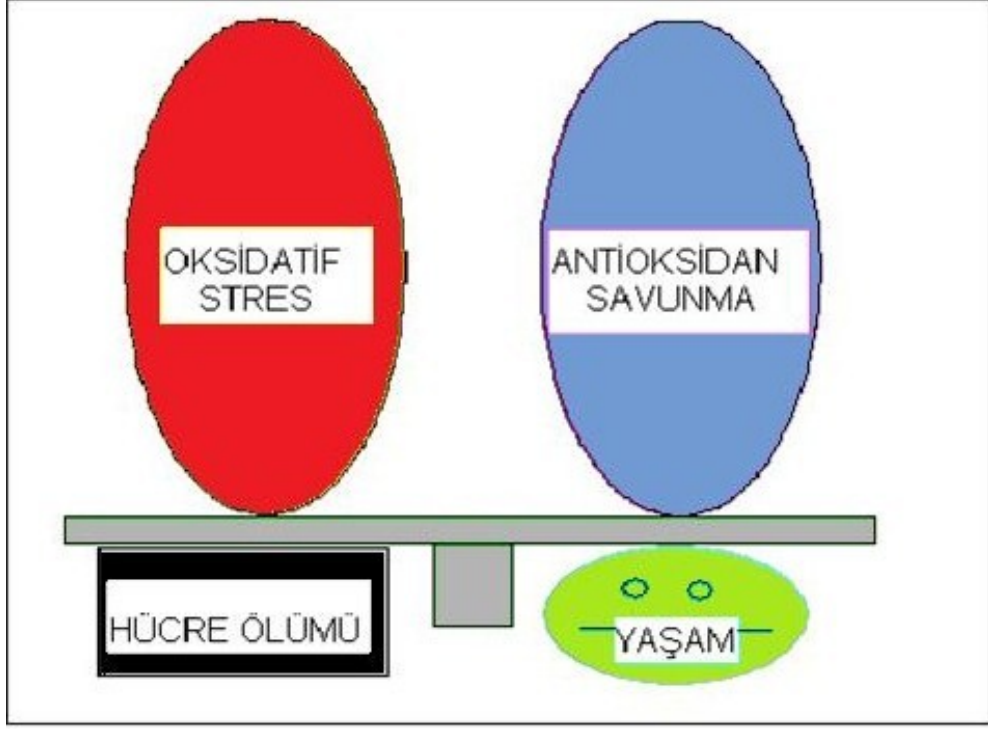


Peroksinitrit güçlü bir oksidandır. Tiyoller ve askorbatın oksidasyonu dışında alfa-tokoferol harcanmasını artırır. Sonuç olarak oksidan dengesini oksidanları artırarak ve antioksidanları azaltarak bozmaktadır (60,61).

NİTROTİROZİN (3-NT): Tirozin artıklarının peroksinitrit ile aromatik yan zincir üzerinden nitratlanabileceği, ilk defa Ischiropoulos ve ark (62,63) tarafından gösterilmiştir. 3-NT, peroksinitrit tutulumunun bir indeksi olarak kullanılabilir (59).

2.2.5. Oksidatif Hasar

Yaşam, reaktif oksijen türlerinin üretilmesi ve bunların aynı hızla antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılması ile karakterizedir. Oksidatif stres durumunda dengenin sağlanabilmesi için antioksidanların sürekli olarak rejenerasyonu zorunludur (Şekil-3) (64).



Şekil 3. Oksidatif stres ve antioksidan savunma arasındaki denge

LİPİDLERDE OKSİDATİF HASAR

Lipid Peroksidasyonu(LPO), hücre membranında bulunan fosfolipid, glisokolipid, gliserid ve sterol yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksit, alkol, aldehid, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli zararlı ürünlere dönüşmesidir (44). LPO işlemi bir reaksiyonlar zinciri olup; üç aşamada gerçekleşmektedir (65).

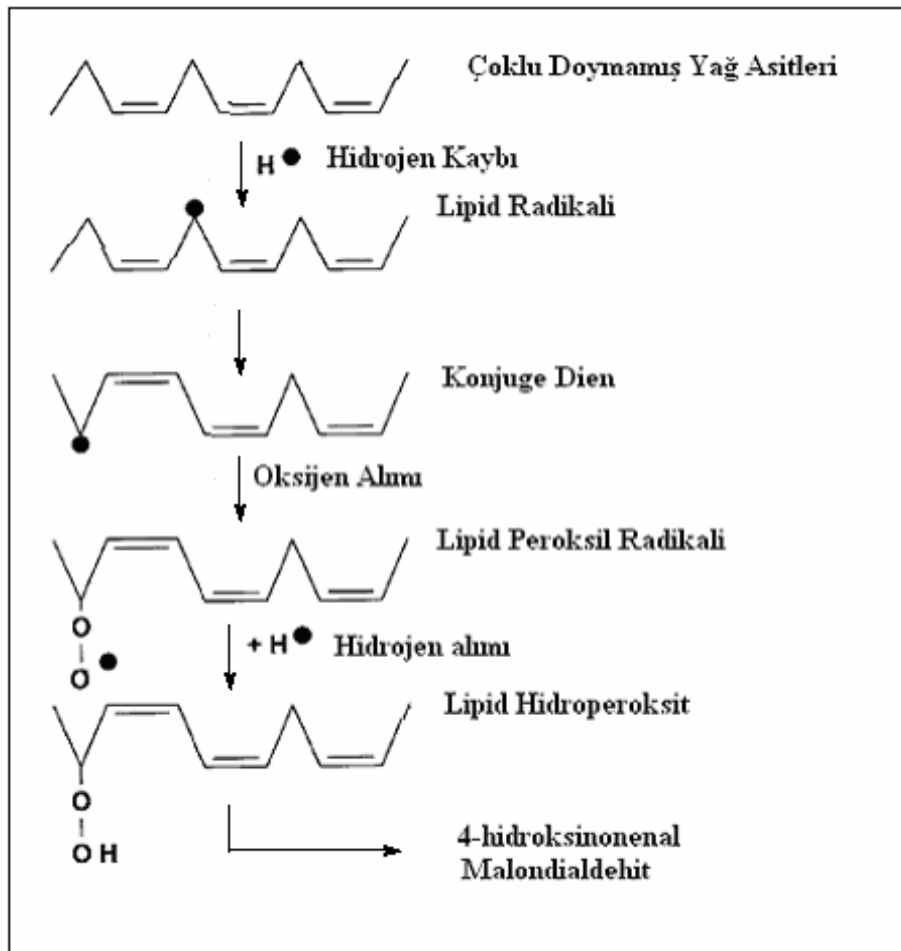
1-Başlama: Lipid peroksidasyonu metal katalizörlerin varlığında, serbest radikallerin çoklu doymamış yağ asiti zincirinin alfa-metilen gruplarından bir hidrojen uzaklaştırması ile başlamaktadır. Uzaklaşan hidrojen atomu sebebiyle, karbon atomu üzerinde ortaklaşmamış bir adet elektron kalır ve bu da yağ asidi zinciri üzerinde radikal oluşmasına sebep olur. Oluşan radikal kararsız bir bileşiktir. Stabil duruma gelebilmek için molekül içi bağlarını tekrar düzenler ve konjuge dien yapısına dönüşür. Bu konjuge dien, fizyolojik koşullarda oksijen ile birleşmeye eğilimli olduğundan reaksiyon sonucu okside olur ve peroksi radikalini oluşturur (42,65).

2-İlerleme: Lipid peroksi radikali, membranda bulunan diğer çoklu doymamış yağ asidi zincirlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşmasına yol açar ve kendisi

de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksite dönüşür. Böylece tek bir substrat radikal diğer yağ asitlerini tetikleyerek birden çok lipid hidroperoksit oluşmasına neden olur (42,65).

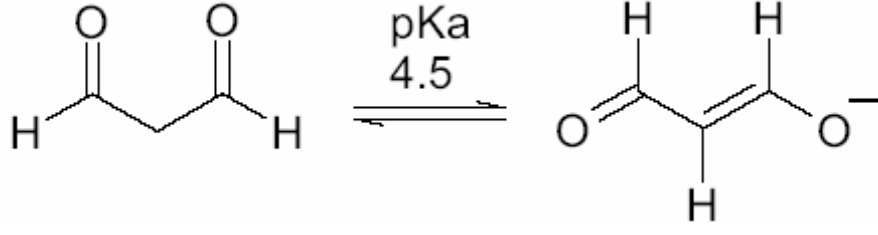
3-Sonlanma: Lipid hidroperoksitlerin aldehit ve diğer karbonil bileşikler ile etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşmesi ile olay sonlanır. Yine antioksidanlar tarafından lipid perokside bir hidrojen atomu verilmesi ile de tamamlanabilir (65).

Lipid Peroksidasyonu sonucunda oluşan ürünlerden en önemlileri; malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE)'dir (Şekil-4) (65,66).



Şekil 4. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünler

MDA; linolenik asit ve araşidonik asit gibi üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin oksidatif bozunması sonucu oluşan bir üründür. Tiyobarbitürik asit ile ölçülebilir (49,65) (Şekil-5).



Şekil 5. MDA'nın yapısı

MDA, uzun ömrü ve yüksek reaktivitesi ile hücre içi ve dışındaki protein, nükleik asit gibi birçok biyomoleküle etki ederek geri dönüşümü mümkün olmayan hasarlara yol açmaktadır. Ayrıca membranın akıcılığının azalmasına, fonksiyonlarının yavaşlamasına, membran reseptör ve enzimlerinin inaktif olmasına ve de Ca^{+2} iyonlarına geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır (49, 65). Lipid peroksidleri ve MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Böylece membranda deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi özellikler değişir. Ayrıca DNA'nın nitrojen bazlarıyla reaksiyona girmesi MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar.

PROTEİNLERDE OKSİDATİF HASAR

Serbest oksijen radikalleri, proteinlerde de yapısal değişiklikler meydana getirebilir. Fakat serbest radikallere karşı proteinler lipidlerden daha az hassastır. Doymamış bağ ve sülfür içeren amino asit (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) içeren proteinler, serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Serbest radikallerin oluşturduğu hasar sonucunda; proteinlerde fragmentasyon, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelir (47,67).

NÜKLEİK ASİTLERDE OKSİDATİF HASAR

Single oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır. Süperoksit (O_2^-) güçlü bir oksitleyici olduğundan, guanin gibi yüksek elektron yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer. Hidroksil radikali(OH^\cdot), deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve DNA'nın yakınında meydana gelirse, pürin ve pirimidin bazlarını etkileyerek mutasyonlara neden olur. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 membranlardan kolayca geçerek ve

hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (67,68).

KARBOHİDRATLARDA OKSİDATİF HASAR

Fizyolojik şartlarda glikoz, mannoz ve deoksi şekerler otooksidasyona uğrayarak, süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2)'i meydana getirirler. Okside olan glikoz, proteinlerle reaksiyona girerek glikozilasyon ve glikasyon ürünlerini oluşturur (68).

2.3. Antioksidanlar

Organizmada serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyucu mekanizmalar vardır. Bunlardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelere genel olarak antioksidanlar denir (47,69).

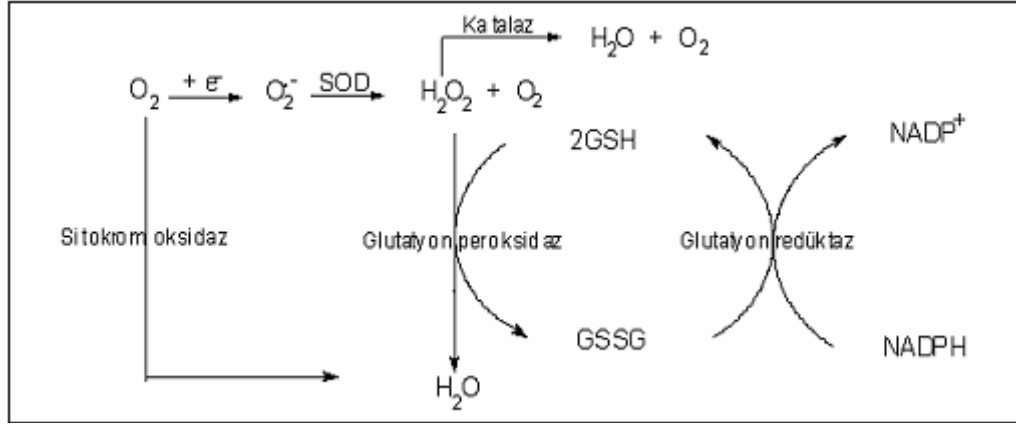
Antioksidanların etki mekanizmaları şunlardır:

1. Yapılarındaki metal iyonlarını bağlayarak,
2. Alkoller gibi radikal olmayan ürünlerine dönüştürülmesi ile peroksitlerin alıcısı olarak,
3. 3-Peroksitler oluşturmak için membran lipidleri ile direkt olarak reaksiyona girebilen singlet oksijeni temizleyerek,
4. Lokalize oksijen konsantrasyonlarını azaltarak,
5. OH^{\cdot} gibi hidrojen atomlarını ayırabilme yeteneğine sahip türlerin temizlenmesi ile peroksidasyonun başlamasını önleyerek,
6. 6-Zincir uzatan radikaller ile reaksiyona girip zincirleri kırmak suretiyle, yağ asidinin kenar zincirinden devamlı hidrojen ayrımını engelleyerek.

Antioksidanları enzimatik ve nonenzimatik olarak iki ana başlık altında incelemek mümkündür (49,69):

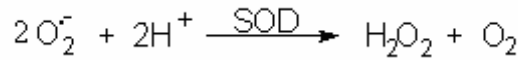
2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

Hücre içerisindeki antioksidan savunmanın belkemiğini oluşturan enzimatik antioksidanlar, aktif merkezlerinde Cu, Zn, Mn, Fe, Se gibi metalleri içerirler. Düzeyleri genetik kontrol altındadır. Hücre içerisinde fazla miktarda bulunanları; süperoksit dismutaz(SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px)'dir (Şekil-6) (49).



Şekil 6. Enzimatik antioksidanlar ve etki mekanizmaları

SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) :İki molekül O₂⁻ 'nin iki molekül proton ile reaksiyona girerek H₂O₂'ye dönüşümünü katalizler. İki serbest oksijen radikalini, radikal olmayan moleküllere dönüştürdüğünden, antioksidan sisteminin en önemli öğelerinden biri olarak bilinir. İnsan vücudunda 3 farklı SOD enzimi vardır;



1- Mn-SOD: Mitokondride ve hücre komponentlerinde bulunur. Kofaktörü mangandır (43).

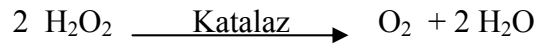
2-EC-SOD: Vasküler endotele bağlı olarak bulunan ekstrasellüler SOD'ın kofaktörleri bakır ve çinkodur. CuZn-SOD ve EC-SOD'ın aktivitesinden bakır, stabilitesinden ise çinko sorumludur (43).

3- Cu/Zn-SOD: Sitoplazmada lokalizedir. Aktif bölgesinde kofaktör olarak bakır ve çinko vardır. En fazla bulunan ve antioksidan savunmada ana rolü oynayan enzimdir. Disülfid köprüsü ile bağlanan birbirinin aynı iki alt üniteden oluşmuştur ve her alt ünite birer atom Cu⁺² ve Zn⁺² içermektedir (43).

Bu üç enzim de beyinde farklı bölgelerde farklı oranda dağılmıştır. Cu-Zn SOD, özellikle astrositlerde; Mn-SOD, nöron ve spinal korda; EC-SOD ise ekstrasellüler matrikste bulunmaktadır. Mn-SOD, O_2^- normal koşullarda mitokondride oluştuğu için, SOR oluşumuna karşı beyni koruyan en önemli enzimdir (70). Mikroglial hücrelerde, oligodendrositlerde ve endotelial hücrelerde Mn-SOD ve Cu-Zn SOD aynı oranda ama zayıf aktivite gösterir. Bu da oligodendrositlerin oksidatif hasara karşı daha savunmasız olduğunu açıklar. Mikroglial hücreler bu hasara daha dirençlidir, çünkü bu hücrelerde GSH-Px aktivitesi yüksektir. EC-SOD, damar düz kaslarında oldukça fazladır; NO biyoyararlanımında, serebral vasküler biyoloji ve vazomotor disfonksiyonda rol oynar(71).

KATALAZ (CAT): H_2O_2 bir radikal olmamasına rağmen, reaktivitesi en fazla olan reaktif oksijen türü olan OH^- 'ın öncüsüdür ve bu nedenle birçok reaktif oksijen türünden daha fazla oksidatif hasara neden olur. CAT solunum yapan tüm organizmalarda bulunan ve iki fonksiyon gösteren bir enzimdir (69,72).

1- H_2O_2 'nin O_2 ve H_2O vermek üzere ayrıştırılması (zehirsizlendirme reaksiyonu)



2-Bir mol peroksitin parçalanması ile oluşan reaksiyon sonucunda; metanol, etanol, formik asit veya fenollerin yükseltgenmesi (69, 72).

GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-Px): H_2O_2 ve lipit peroksitlerin indirgenmiş (redükte) glutatyonla (GSH) reaksiyona girerek, H_2O ve yükseltgenmiş (okside) glutatyon (GSSG) oluşmasını katalizleyen enzimdir (73).



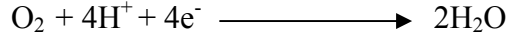
Bu enzimin varlığı ilk defa Mills (55) tarafından 1957 yılında memeli eritrositlerinde saptanmıştır. Endotel hücrelerinde özellikle akciğerde etkili bir enzimdir. Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında, % 25-40'ı ise mitokondride bulunur. Aktivitenin en fazla olduğu dokular ise eritrositler ve karaciğerdir (74). GSH-Px, yaklaşık olarak 85000 D molekül ağırlığında, dört eşit

subunitten oluşan, mol başına 4 atom selenyum içeren bir enzimdir. Enzimin aktif bölgesinde lenosistein bulunur. İnsan dokularında iki GSH-Px formu belirlenmiştir:

1-Se-bağımlı GSH-Px: Substrat olarak hem H_2O_2 'yi, hem de organik hidroperoksitleri kullanır(72, 74).

2-Se-bağımsız GSH-Px: Substrat olarak organik hidroperoksitleri kullanır, H_2O_2 yıkılığını kataliz etmez. (72, 74).

SİTOKROM OKSİDAZ: Sitokrom oksidaz, mitokondrial ETZ'nin son parçasıdır ve elektronların son alıcı olan oksijene transferinden sorumludur. Bu bölgede taşınmış olan elektronlar, O_2 ve serbest protonlar; H_2O oluşturmak için bir araya gelirler. Diğer bir deyişle, bu reaksiyon ile süperoksit detoksifiye edilir (47).



2.3.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar

VİTAMİN A: Bir antioksidan olan beta-karoten, konjuge alkil yapısı taşıyan serbest organik peroksit radikallerinin ortadan kaldırılmasında etkilidir. Düşük oksijen kısmi basıncında beta-karoten, peroksit radikallerinin dokularda tutulmasından sorumludur (74).

VİTAMİN E: Membranlarda ve lipoproteinlerde zincirleme LPO'yu engelleyen esas antioksidandır. Reaksiyon bir peroksi radikali ile tokoferolün, organik bir hidroperoksit ve tokoferil radikali meydana getirmesi ile sonuçlanır (52,72).

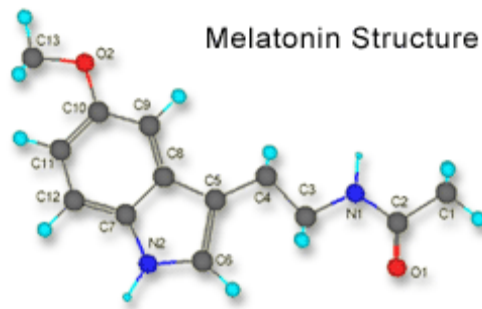
VİTAMİN C (ASKORBİK ASİT): Organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. $O_2^{\cdot-}$ ve OH^{\cdot} ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Tokoferoksil radikalının alfa-tokoferol'e redüklenmesini sağlar(75).

ERİTROPOİETİN (EPO): Antioksidan etkisini NO miktarını azaltarak ayrıca SOD, GSH-Px, katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak da gerçekleştirmektedir (63). Eritropoietin (EPO), eritropoezi regüle eden 30,4 kDA ağırlığında bir glikoproteindir (76). Hücre canlılığını arttırıcı sinyalleri modüle eden antiapoptotik, anti-oksidan, anti-inflamatuvar ve kalsiyum ile glutamat metabolizmaları

üzerine düzenleyici etkilerinin, nöroprotektif etkisine aracılık edebileceği düşünülmektedir.

MELATONİN (MEL):

İlk kez 1958 yılında kurbağa ve balıkların melanositlerinde bulunan bir renk pigmenti olarak tanımlanmış (78) daha sonra 1993 yılında bütün memeli hayvanlarda bulunan ve pineal bezden salınan, canlıların biyolojik ritmini düzenleyen bir hormon olduğu gösterilmiştir. 1996 yılından itibaren omurgasızlar ve protozoalar da dahil olmak üzere birçok canlının yapısındaki varlığı ispatlanmıştır (Şekil-7)(79).



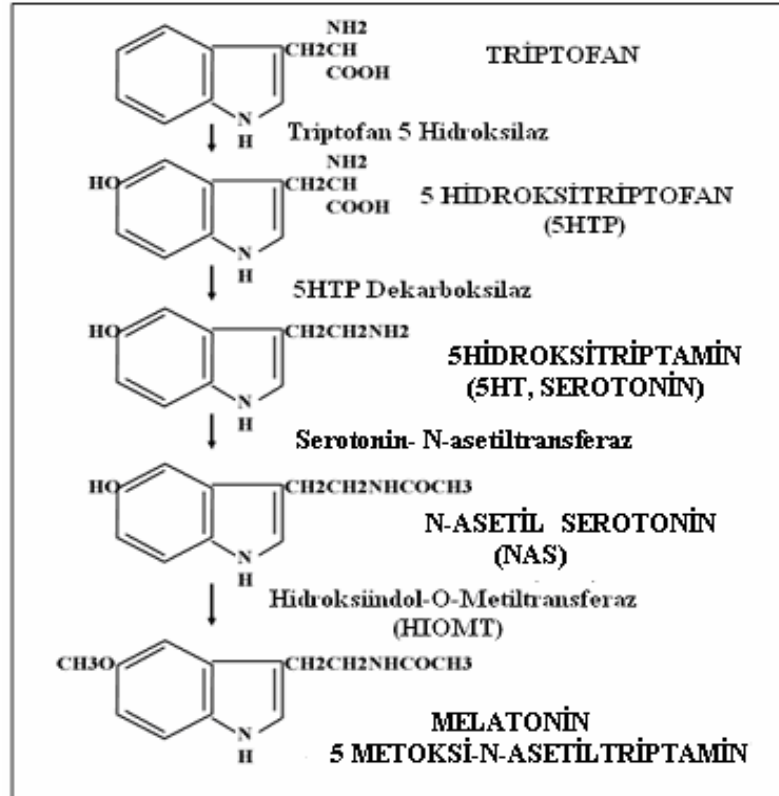
Şekil 7. N-asetil-5metoksitriptamin (Melatonin)

Pineal bez (epifiz bezi), insanlarda üçüncü ventrikülün arkasında yer alır. Total vücut ağırlığına göre oldukça küçük olan bu bez (insanlarda 50-150 mg), böbrekten sonra vücudun en çok kan akımına sahip ikinci organıdır. Bezin yapısı, bez hücrelerinin çoğunu oluşturan ve gerek indolaminleri (çoğunluğu melatonin) gerekse peptidleri (arjinin, v.b) üreten pinealositler ve nöroglia hücreleri olmak üzere iki hücre türünden oluşur. Pineal bez, memelilerde fotik informasyonları nöroendokrin sinyallere dönüştürür. Retinadan algılanan görsel bilgiler, hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeği ve sempatik sinir sistemi yoluyla, pineal beze yansıtılır (80). Fotik impulslar taşıyan sempatik efferent lifler pineal beze ulaştığında, özellikle karanlıkta, norepinefrinin pinealosit membranında beta-adrenerjik reseptöre bağlanması ile bir seri reaksiyon başlar. Membranda adenil siklaz aktivitesi ve dolayısıyla cAMP yapımı stimüle olur; cAMP de melatonin ve diğer indolaminlerin biyosentezini katalizleyen enzimleri aktive eder (81).

MELATONİN SENTEZİ

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) ilk kez sığır pineal ekstrelerinde melanin granüllerini agrege etme ve kurbağa derisinin rengini açma yeteneği fark edilerek tanımlanmıştır (78).

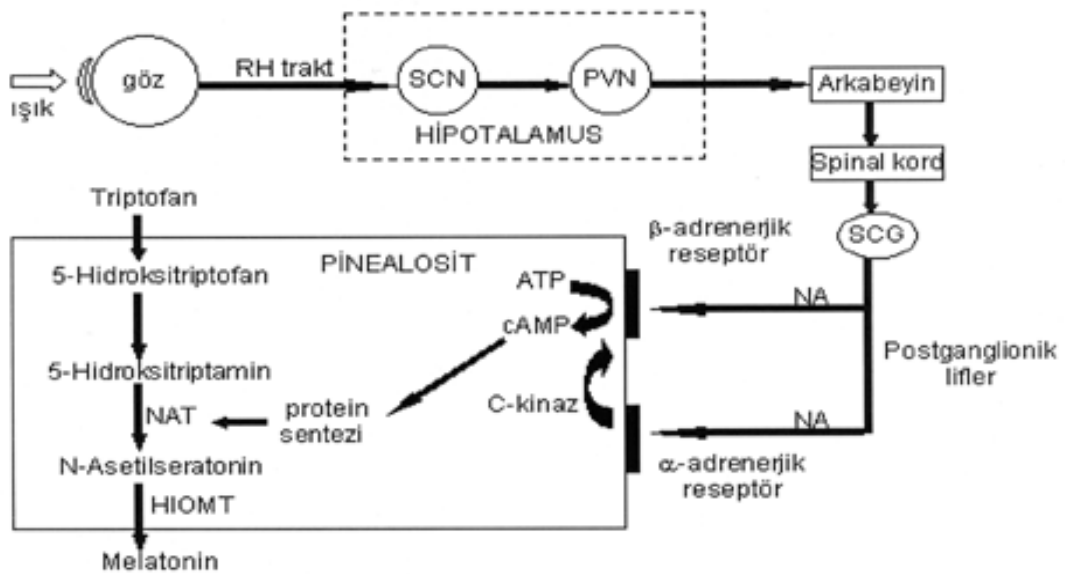
Melatonin biyosentezi, kandan beze difüze olan triptofanın, pineal bezde triptofan hidroksilaz enzimi ile hidroksillenmesiyle başlar. Böylece meydana gelen 5-hidroksi triptofan, L-aromatik aminoasit dekarboksilaz enzimi ile karboksil grubunu kaybeder ve neticede serotonin (5-hidroksi triptamin) meydana gelir. Pineal bez, serotonin konsantrasyonu açısından vücutta en zengin organdır. Serotonin asetilasyonu, N-asetil transferaz aracılığı ile gerçekleşir. Burada Asetil CoA, asetil donörü olarak rol oynar. Meydana gelen N-asetil serotonin, metil donörü olarak S-adenozilmetionin'in kullandığı ve hidroksi indol-O-metil transferaz'ın katalizlediği son basamakta N-asetil 5-metoksitriptamin; melatonin'e dönüşür ve böylece melatonin biyosentezi tamamlanır (80,82) (Şekil-8).



Şekil 8. Melatonin sentezi

Bu mekanizmada hız kısıtlayıcı enzim aril-alkilamin-N-asetil transferaz (AANAT) olarak adlandırılan enzimdir. Bu enzim, beta ve alfa-1 adrenerjik reseptörler üzerinden etki gösteren epinefrinin noktural sempatik salgısına yol açar. Bu enzimin negatif feedback mekanizmaları ile düzenlenmesinde ise cAMP, ICER, MAP kinaz fosfataz 1 gibi birçok enzim ve proteinin rol aldığı bilinmektedir (83).

Melatonin salgısı, türlere göre farklılık gösteren sirkadiyen bir ritme sahiptir. Bu farklılık, hormonun gece pikinin meydana geldiği saatler ve süreleri ile ilişkilidir. Serum melatonin konsantrasyonu, geceleri gündüze göre 3-10 kat daha yüksektir. Melatonin salgısının sirkadiyen ritmi endojen kökenlidir, bu da uyarıların suprakiazmatik çekirdekten çıktığını yansıtır (82). Melatonin sentezi ve salgılanması karanlıkta uyarılır, ışık ile baskılanır. Gün ışığının bulunduğu saatlerde, retinadaki fotoreseptör hücreleri hiperpolarizedir; bu da norepinefrin salınmasını baskılar. Karanlıkla birlikte polarize olan fotoreseptör hücreler norepinefrin salgırlar. Norepinefrin hem triptofanın dolaşımından beze girişini artırmakta, hem de pinealosit membranındaki beta-1 reseptörleri aracılığıyla membrandaki adenil siklazı aktive ederek, hücre içi siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyelerini yükseltmektedir. cAMP etkisiyle, melatonin sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan N-asetil transferaz aktivitesi yükselmekte, böylece melatonin sentez ve salgılanması başlamaktadır. Melatonin sentez ve salımı arttıkça hormon, pasif difüzyonla dolaşıma geçmektedir (Şekil-9) (84).



Şekil 9. Melatonin sentezinin kontrolü

SCN; Suprakiazmatik nükleus, RH; retinohipotalamik, PVN; Paraventriküler nükleus, SCG; Superior servikal ganglion, NA; Norepinefrin,

NAT; 5-Hidroksitriptamin-Nasetiltransferaz,

HIOMT; Hidroksiindol-O-metiltransferaz.

MELATONİNİN ETKİ MEKANİZMASI

Lipofilik özelliğinden dolayı direkt olarak veya spesifik reseptörler aracılığıyla hedef hücrelere ulaşır (84). İnsanda beynin çeşitli bölgelerinde, bağırsaklarda, overlerde, kan damarlarında ve karaciğerde, melatonin reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. İki melatonin bağlanma yeri tanımlanmıştır:

1-MT1 (yüksek afinite (pikomolar) yerleri: MT1 reseptörlerinin aktivasyonu hedef hücrelerde adenilat siklaz aktivitesinin baskılanmasına sebep olur. MT1 reseptörü aracılığı ile, termoregülasyonda, arterial vazokonstriksiyonda, kanser hücrelerinin proliferasyonunda, üreme ve metabolik fonksiyonlarda rol alır.

2-MT2 (düşük afinite (nanomolar)) yerleri: MT2 reseptörü aracılığıyla ise, suprakiazmatik nükleusdaki nöronal termoregülasyonda, retinada dopamin salgısının inhibisyonunda, vazodilatasyonun indüklenmesinde, arterial yatakta lökosit rulo formasyonunun oluşumunun engellenmesinde ve immun cevabın artırılmasında rol oynadığı bilinmektedir (85,86,87).

Lipofilik özelliği nedeniyle hücrenin tüm fraksiyonlarına kolaylıkla girebilen melatoninin (88), sitozolik ve nükleer bağlanma yerleri de tanımlanmıştır. Örneğin; sitozolik kalmodulin'e bağlanarak adenilat siklaz, fosfodiesteraz gibi hedef enzimlerle olduğu kadar yapısal proteinlerle de etkileşerek doğrudan kalsiyum geçişi üzerinde de etki gösterebilir (89).

Melatoninin inaktivasyonu, başlıca karaciğerde gerçekleşir. İndol halkasının 6. konumundan hidroksile olan melatonin, daha sonra sülfat ve glukronik asitle konjuge edilerek idrarla atılır. Melatoninin idrardaki başlıca metaboliti 6-sülfatoksimelatonin olup, plazma melatonin düzeyinin iyi bir göstergesidir. Diğer metaboliti ise; N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) molekülüdür (90).

MELATONİN'İN BİYOLOJİK ETKİLERİ

Melatonin'in uyku, yaşlanma, sirkadiyen ritim, duygu durumu, cinsel olgunlaşma ve üreme, kanser, termoregülasyon gibi birçok etkisi olduğu bildirilmiştir(90).

MELATONİN VE YAŞ

Araştırmalar melatoninin yaşla birlikte azaldığını ve Alzheimer hastalarında yaşlılarına oranla daha azalmış seviyelerin bulunabileceğini göstermiştir. Brusco ve arkadaşlarının çalışmasında 8 yıldır Alzheimer hastası olan bir monozigot ikiz çiftinde ikizlerden biri her akşam 6 mg melatonin ile tedavi edilmiş ve artmış uyku alışkanlıkları, durum (mood) düzelmesi ve hafıza fonksiyon gelişimi bildirilmiştir. Bu da melatoninin Alzheimer hastalarında yararlı etkileri olabileceği hipotezini destekler. Yakın zamanda bazı klinik sonuçlar serebrospinal sıvı melatonin seviyelerindeki azalmanın, muhtemelen klinik semptomlardan bile önce gerçekleşen, Alzheimer hastalığı gelişimindeki bir erken olay olabileceğini akla getirir (92).

Melatoninin yaşlanma ile birlikte azalması zararlı oksijen radikalleri ile oluşturulan hasarı artırır. Melatonin düzeyinin azalması, birçok dokuda guanilat siklaz aktivitesinde azalma ve sonuçta hücre zar kalınlığı ve rijiditesinin artmasına, dejeneratif hasar oluşumunda hızlanmaya yol açar. Bütün bunlar aterosklerotik değişiklikleri de içeren yaşlılıkla ilgili birçok sürecin oluşmasına neden olur. Yaşlılıkta, nöronlar üzerine serbest radikal saldırısı, birçok nörodejeneratif durumun oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Antioksidanların kapasitelerinin azalması ile serbest radikal üretimin de artması, yaşlanma süreci, şizofreni, tardiv diskinezi ve Parkinson hastalığının fizyopatolojisinde rol oynar. Melatonin, serbest radikallerce oluşturulan nörotoksisiteyi engelleyebildiğinden, yaşın ilerlemesi ile melatonin salımının azalması yaşlanma sürecini kolaylaştırmaktadır. Melatoninin yaşlanmaya karşı koruyucu etkisi, serbest radikallerin oluşturduğu hücre hasarını azaltmak ya da immüniteyi düzenlemek suretiyle kendini gösterir (92).

Melatonin ayrıca nörodejeneratif hastalıkların birçoğunda önemli etkileri olan nitrik oksit molekülü ile de yakından ilişkili olması nedeniyle yaşlanma sürecinde doğrudan ve dolaylı olarak birçok etkiye sahiptir. Bu nedenle de bu tip hastalıklarda ve

yaşlanmaya karşı koruyucu özelliği nedeniyle terapötik ajan olarak kullanımı üzerinde oldukça önemli çalışmalar vardır (91).

Melatonin seviyelerinin yaşla birlikte azalmasıyla ile aynı doğrultuda perimenopoz ve postmenopozal kadınlarda melatonin uygulaması duygu-durumda genel bir iyileşme ve depresyonda önemli bir hafifleme göstermiştir. Altı aylık tedavi perimenopozal kadınlarda (43-49 yaş arası) LH'de ve tiroid hormonunda bir azalma gösterirken daha yaşlı kadınlarda (50-62 yaşlar) hiçbir etki görülmemiştir. Her iki yaş grubunda bir depresyon hafiflemesi görülmüştür. Bu bulgular melatoninle tedavi edilmiş kadınlarda tiroid fonksiyonunun yanı sıra çeşitli hipofizer regülasyonların da daha juvenil bir form gösterebileceğine işaret edebilir (92)

MELATONİN VE UYKU

Melatoninin uyku kalitesi, REM ve non-REM uyku üzerine etkileri oldukça karmaşık bir mekanizmadır (87). Beyinde monoamin nörotransmitter düzeylerini etkileyerek uyku mekanizmalarını aktive etmektedir. Uykuya dalma gücünü çeken yaşlılarda serum melatonin konsantrasyonları yetersiz bulunmuştur.

Jet lag çoğunlukla birkaç zaman bölgesi geçen hava yolcularını etkiler ve internal vücut ritmi ile varış yerindeki gündüz/gece siklusu arasındaki sapmadan kaynaklanır. Bir meta-analizde oral melatoninin jet lag'ı azaltmadaki etkisi araştırılmış ve on çalışmanın dokuzu varış yerinde yatma zamanına yakın alınan melatoninin beş veya daha fazla zaman bölgesi boyunca yapılan uçuşlarda jet lag'ı azalttığını göstermiştir (92).

Ekzojen melatoninin beynin elektriksel aktivitelerini dengeleyici etkisiyle (alfa beyin dalgasının oluşumunu artırarak) uykuya dalma süresini kısalttığı, total uyku periyodu esnasında uykudan uyanış sayısını azalttığı, uyku kalitesini artırdığı ve hipnotik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Elektrofizyolojik kayıtlarda da gece uyku halinde artış ile, idrarda 6-sülfoksimelatonin atılımı arasında önemli bir korelasyon saptanmıştır (93).

Burada başta suprakiazmatik nükleus olmak üzere biyolojik osilatörler denilen yapıların önemli rolü vardır. Son dönemlerde yapılan çalışmalar, bu osilatörlerin resetlendiği gece vardiyası çalışmaları ile bu konu gün geçtikçe netlik kazanmaktadır(94,98).

MELATONİN VE ÜREME

Normal sağlıklı kadınlarda melatonin salgısı, menstrüel siklusla değişiklik göstermez. Ancak melatonin, overler tarafından salgılanan ve prolaktin yapımını idame ettiren estradiol salgısını baskılamaktadır.

Benzer şekilde normal döngüleri olan infertil kadınlarda serum estradiol düzeylerindeki belirgin artışlar, melatonin salgısını etkilememektedir. Serum melatonin konsantrasyonları, hipotalamik amenoreesi olan kadınlarda artmaktadır (96).

Doğal bir kontraseptif olarak denenmesine rağmen melatonin, kontraseptif amaçlar için kullanılamaz. Çünkü yeterince etki göstermez ve ihtiyaç duyulan dozları uyku halinin yanı sıra irregüler kanama gibi istenmeyen yan etkiler de oluşturmuştur(95).

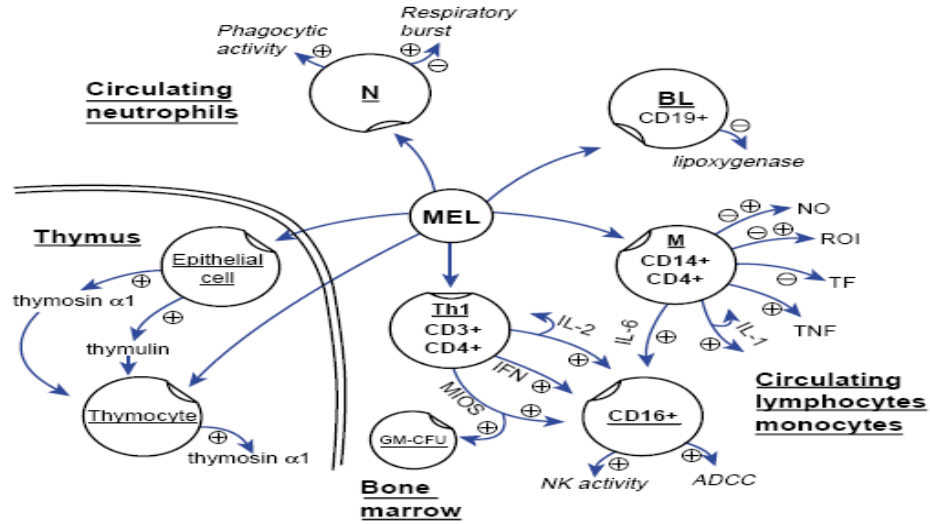
Son yıllarda protein kinaz A aktivitesini ve cAMP düzeylerini düşürmesi nedeniyle ve GnRH ile indüklenmiş gonadotropin yapımını azaltması nedeniyle üreme sistemi üzerine etkileri netlik kazanmıştır. GnRH'ın etkisini ise Ca^{+2} akışını azaltmak suretiyle inhibe ettiği gösterilmiştir (97).

Melatonin plasentayı geçebilir ve fetal sirkülasyona girebilir. Melatonin reseptörleri başlangıçtan fetal gelişimin sonuna kadar fetüste bulunurlar. Artmış fetal anomali riskleri nedeniyle eksojen uygulamadan sonra yüksek melatonin konsantrasyonlarından kaçınılması gereklidir. Melatoninin ACTH ve beta-endorfin'i etkilediği ve immun sistemi baskıladığı hipotezi öne sürülmüştür. Bu hipotezin deneysel bir kanıtı yoktur, ancak o zamana kadar gebe kadınlar melatonin almaktan sakınmalıdırlar (92).

MELATONİN VE İMMÜN SİSTEM

İmmün cevabı artırarak tümör büyümesinin baskılanması ve stresin neden olduğu immün baskılanmanın ortadan kaldırılması gibi etkilere yol açmaktadır. Fareler üzerinde yapılan araştırmalar melatoninin kemik iliği T lenfositlerde interlökin-4 (IL-4) yapımını ve stroma hücrelerinde granülosit makrofaj koloni stimulan faktör yapımını uyardığını, ayrıca kemik iliği hücrelerini, sitotoksik bileşimlerin neden olduğu apoptozisten koruduğunu göstermiştir. Radikal temizleyici olarak görev alan vitaminlerin yetersizliği gibi kış aylarında besinlerin daha düşük oranda sağlanabilmesi

nedeniyle immün fonksiyon aşırı oranda düşebilir. Melatonin konsantrasyonları kış döneminde artış göstermektedir.(99) Melatoninin immün sistem molekülleri üzerine olan etkileri aşağıdaki şemada(Şekil-10) kısaca özetlenmiştir (99).



Şekil 10. Melatoninin immün sistem üzerine etkileri

MELATONİN VE AĞRI

Ratlar ve fareler üzerine yapılan yeni deneyler bariz bir şekilde melatoninin morfin ve diazepam ile sinerjistik analjezik etkilerini göstermiştir ki bu, melatoninin, ağrılı hastalarda anestezi için yardımcı bir ilaç olarak yer alabileceğini düşündürür (92). Normal kontrol grubuyla kıyaslandıklarında fibromiyalji hastalarında daha düşük melatonin seviyeleri olduğu saptanmıştır. 30 gün boyunca süren 3 mg'lık melatonin replasmanı yakınmaları azaltmıştır (92).

MELATONİN VE KANSER

Melatonin ile kanser arasında karşılıklı bir ilişki vardır, çünkü melatonin onkostatik bir ajan olarak hareket eder ve endometriyum kanseri gibi belirli kanserlerden muzdarip hastalarda melatoninin azalmış olduğuna dair kanıtlar vardır.

Hayvan deneyleri melatoninin in vivo ve in vitro melanoma ve meme kanserinin büyümelerini inhibe ettiğini göstermiştir. Gece yarısında ışık melatoninini azaltır ve sonuç olarak meme kanseri insidansını arttırması gerekir; aksi takdirde, kör insanlar melatonin seviyeleri daha yüksek olduğundan dolayı daha düşük meme kanseri seviyeleri göstermelidir. İsveç'ten, Finlandiya'dan, Amerika'dan ve ek olarak yakın bir geçmişte

Norveç'ten yapılan çalışmalar, 'melatonin hipotezi'yle hemfikir olarak gerçekten de kör kadınlardaki meme kanseri insidansının genel populasyona göre daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte melatoninin kanserlere karşı koruyucu olduğu sonucunu çıkarmak için çok yetersiz sayıda vaka vardır. Melatoninin inhibe edici etkisi en fazla, meme kanseri veya prostat kanseri gibi kısmen hormonal etki altında olan tümörlerde telaffuz edilir. Ayrıca melatonin, doymamış yağların metabolizması üzerindeki bir reseptör-aracılı etkisiyle karaciğer kanserini inhibe eder (92)

Diğer bir yandan lösemi melatonin uygulaması ile şiddetlenir ve pinealectomi ile inhibe olur. Mevcut çalışmalar göstermektedir ki dolaşımdaki nokturnal melatonin seviyeleri bir meme, prostat ya da endometrium kanserinin başlangıcında düşüktür. Hayvan çalışmaları melatonin salınımının daha az olmadığını ancak düşük seviyelerin, kanser hücreleri tarafından uptake'in artmış olmasının bir sonucu olduğunu göstermiştir. Antikanser etki ayrıca radikal temizleyici membran değişimi ya da diğer etkiler sayesinde de olmuş olabilir. İnsan deneyleri kanserli hastalarda interleukin 2 (IL-2)'nin induklendiğini ve interleukin-6 ile neopterin'i azalttığını göstermiştir (92).

Melatoninin meme kanserinde oldukça etkili olduğu, meme bezinde antiöstrojen etki göstererek anti-tümoral etki yaptığı ileri sürülmektedir (96). Mitojenik aktiviteyi azaltarak, kanserli dokuda hücre proliferasyonunu durdurmaktadır. Tümör büyümesini hızlandıran prolaktin, büyüme hormonu, gonadotropinler gibi hormonların salınımını baskıladığı bildirilmiştir (97). Melatoninin oldukça güçlü antioksidan etkisi, serbest radikal aracılı kanser oluşumunu önlemektedir (100).

MELATONİN VE DEPRESYON

Major depresif hastalarda bir melatonin tedavisi tavsiye edilemez. Faz gecikmesi olan unipolar depresif hastalarda melatonin tedavisi bir yarar sağlayabilir (92).

MELATONİN VE ATEROSKLEROZ

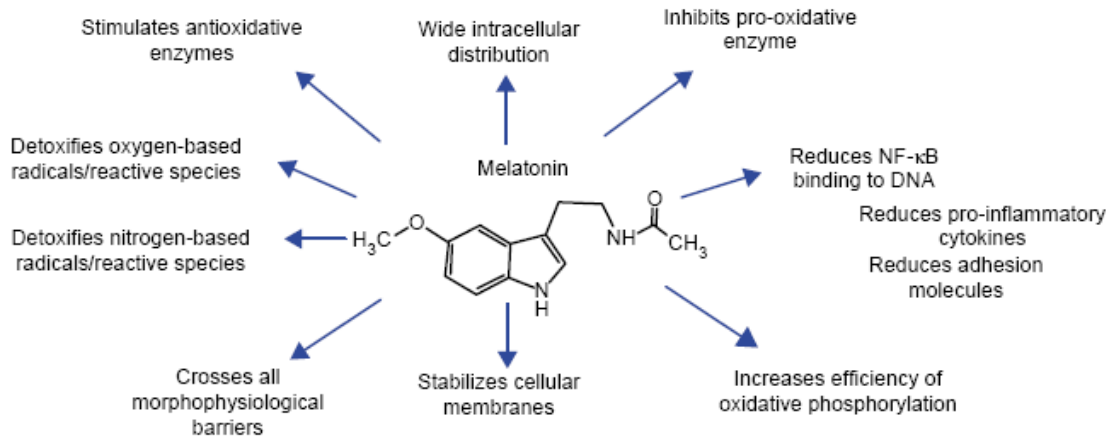
Ateroskleroz patogeneğinde, lipid peroksidasyonu önemli bir role sahiptir. Damar endotelinin oksijen radikalleri ve lipid peroksidlerine karşı çok duyarlı olması, serbest radikallerin vasküler düz kas proliferasyonunun artırmasına yol açmaktadır. Melatonin güçlü antioksidan etkisi ile aterosklerozun önlenmesini sağlamaktadır. Melatoninin kolesterol metabolizmasını düzenleyici etki gösterdiği, düşük dansiteli

lipoprotein (LDL) reseptör sayısını azaltarak LDL metabolizmasında rol oynadığı bildirilmiştir (101).

MELATONİNİN ANTIOKSİDAN ETKİSİ

Melatoninin bir radikal temizleyici olarak hareket ettiği ve ultraviyole nedenli eritemin neden olduğu hasara karşı koruyucu potansiyeli her iki gözü de kör insanların kapsandığı bir randomize çalışmada gösterilmiştir. Melatonin E vitamini ve C vitamini ile birlikte uygulandığında yalnız başına uygulandığından daha iyi koruma elde edilmiştir (92)

Başta kalp hastalıkları ve kanser olmak üzere birçok dejeneratif hastalıkların etiyojisinden serbest radikal hasarı sorumlu tutulmaktadır. Antioksidan moleküller bu hasarı önlemektedirler. Melatoninin de antioksidan etkisi in vivo (102) ve in vitro (103) çalışmalarla gösterilmiştir. Melatonin yapısında bulunan pirol halkası nedeniyle O₂ ve OH⁻ radikallerini yakalamada yüksek bir kapasiteye sahiptir. Toksik hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek, bütün hücre kompartmanlarındaki biyomolekülleri, serbest radikal oluşumuna karşı bölgesel olarak yerinde korur. Çok reaktif olan hidroksil radikallerinin yıkıcı etkilerine karşı primer nonenzimatik savunma mekanizmasını oluşturur ve yapılan araştırmalarda organizmayı oksidatif hasara karşı korumada melatonin bilinen diğer antioksidanlardan (mannitol, glutatyon, E vitamini, askorbik asit gibi) daha etkili görülmüştür (104). Askorbik asit (C vitamini), alfatokoferol (E vitamini) ve glutatyon (GSH) gibi antioksidanlardan farklı olarak, melatonin peroksid radikalini yakalayarak, yayılmakta olan lipid peroksidasyonunu sonlandırmaktadır. Melatoninin bu etkilerinin diğer antioksidanlardan daha güçlü olduğu, in vitro (103) ve in vivo (102) çalışmalarda gösterilmiştir. Melatonin direkt antioksidan etkilerinin yanı sıra, dolaylı olarak da antioksidan sisteme katkıda bulunur. Sıçanlarda karaciğer, böbrek ve beyin dokusu glutatyon peroksidaz aktivitesinin, melatonin uygulandıktan sonra arttığı gözlenmiştir. Pinealektomi yapılan sıçanların karaciğer, akciğer ve beyin dokusu glutatyon peroksidaz aktivitesinde anlamlı düşüşler saptanmıştır (104).



Şekil 11. Melatoninin antioksidan fonksiyonu

1993 yılında antioksidan özelliği ortaya çıkarılan melatonin (105), lipofilik özelliğinden dolayı organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Melatonin, kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçebilir, hücrelerin çekirdekleri dahil tüm organellerine ulaşabilir. Bu özellik, dejeneratif ya da proliferatif değişikliklere neden olan hastalıklara karşı makromoleküllerin ve özellikle DNA'nın oksidatif hasardan korunmasında melatonine bir üstünlük kazandırmaktadır. Ancak bu antioksidan etkiler, melatoninin gece ulaştığı doruk değerlerin çok üstündeki değerlerde görülür. Melatoninin bu bağlamda başka bir üstünlüğü, diğer bazı antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300mg/gün) ve uzun süre (5 yıl) kullanımda bile toksik etkisinin görülmemesidir (106).

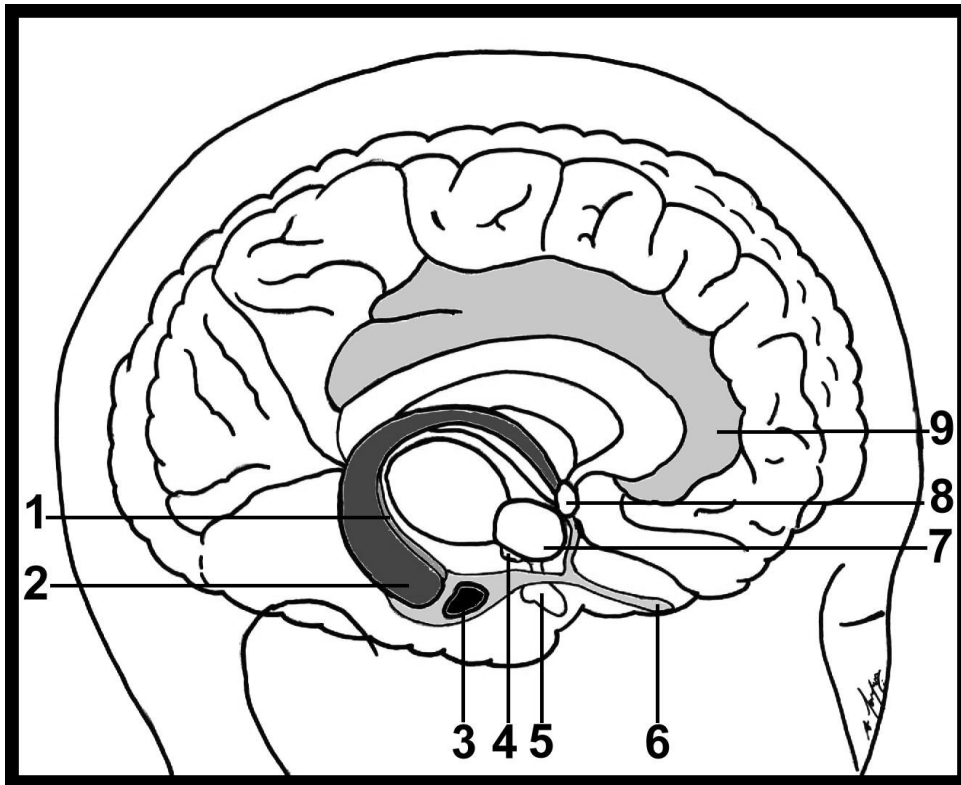
Son yıllarda melatoninin doğrudan serbest radikalleri temizleme özelliğinin yanı sıra, ekzojen melatonin verilmesinin, önemli bir antioksidan enzim olan glutatyon peroksidaz aktivitesini de artırdığı gösterilmiştir (104). Ayrıca melatoninin birçok fizyolojik ve patofizyolojik olayda rol alan önemli bir molekül olan nitrik oksit (NO)'in, sentezi ve dolaşımdaki miktarı üzerine etkilerini inceleyen birçok çalışma yapılmıştır. NO'nun fizyolojik etkisi; çözünebilir guanilat siklazın cGMP oluşturmak üzere aktive olmasıyla gerçekleşmektedir. Melatonin düzeyinin azalması birçok dokuda guanilat siklaz aktivitesinin azalmasına neden olur. Bunun sonucu olarak cGMP düzeyi azalır, cAMP düzeyi artar. Böylece hücre membran kalınlığı ve rijiditesi artarak dejeneratif hasar oluşumu hızlanır. Yaşlanma sürecinin incelenmesi sırasında ortaya çıkan bu özelliği melatoninin, nitrik oksit sentaz enziminin aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesine neden olmuş ve bu çalışmalar sonucunda melatoninin aynı zamanda

oldukça etkili bir nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü olduğu bulunmuştur (107). NO ile melatonin arasındaki ilişki incelendiğinde, melatoninin NO ile nitrosomelatonin oluşturmak üzere reaksiyona girdiği (108) ve O₂ varlığında NO ile O₂'nin reaksiyona girmesi sonucu oluşan peroksinitrit anyonunun da melatonin tarafından tutulduğu ileri sürülmüştür (109). Melatoninin gerek doğrudan gerekse dolaylı yollarla oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerinin bulunması kardiyovasküler hastalıklar, kanser, ateroskleroz, sepsis gibi oksidatif hasarın rol oynadığı patolojik olaylardaki öneminin gün geçtikçe artmasına neden olmaktadır.

2.4. NMDA Reseptörleri

2.4.1. Hipokampüsün Anatomisi, Yapısı ve Fonksiyonları

Hipokampüs, temporal korteksin lateral ventrikülünün alt boynuzunun tabanı boyunca uzanan, kıvrılmış bir gri cevher kabartısıdır (Şekil-12). Hipokampüse bu ad, koronal kesitte denizataına benzediği için verilmiştir (110).



Şekil 12. Hipokampüs ve limbik sistem

1- gyrus dentatus, 2- hippocampus,
 3- corpus amygdaloideum, 4- corpus mamillare, 5- hypophysis, 6- bulbus
 olfactorius, 7- hypothalamus, 8- commissura anterior, 9- gyrus cinguli.

Hipokampus, limbik sistem içerisinde önemli fonksiyonlarıyla odak noktasını oluşturmaktadır. Hipokampus ve ona bağlı temporal lop yapıları; serebral korteks, amigdala, hipotalamus, septum, mamiller cisimler gibi temel limbik sistem bölgeleriyle sayısız indirekt bağlantılar gösterir ve "hipokampal formasyon" adını alır. Yeni edinilen bilgilerin depolanmasında hipokampal formasyonun önemli rolü olduğu bilinmektedir. Hareket, yürüme ve diğer motor işlerde major rol oynamaktadır. Hipokampusu etkileyen lezyonu olan hastalarda kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülemediği gözlemlenmiştir. Lezyonun sol hipokampüste olduğu zamanda daha çok sözel hafıza etkilenirken, sağda olduğu durumlarda görsel hafıza etkilenmektedir. Hipokampusün iki taraflı ablasyonunda kişi, hergün gördüğü insanların yüzlerini ve isimlerini hatırlamayabilir. (111).

2.4.2. Glutamat Reseptörleri

Glutamat, memeli SSS' inde önde gelen eksitatör nörotransmitterdir (112). Kortikospinal motor nöronların spinal motor nöronlara yaptığı sinapslarda major nörotransmitter glutamattır. Normalde üst motor nöron eksitasyonu ile glutamat molekülleri sinaptik aralığa düşmekte ve spinal motor nöronlardaki (postsinaptik) reseptör yerlerine giderek spinal motor nöronları depolarize etmektedirler. Glutamat reseptörleri hafıza ve öğrenme fonksiyonlarına katkıda bulunan sinaptik iletide rol alırken, bir yandan da sinir sisteminin gelişimi esnasındaki nöronlar arası bağlantının da oluşturulmasına katkıda bulunmaktadır (112,113).

Glutamat reseptörleri, temelde postsinaptik membranda lokalizedir. Başlıca 2 tipi vardır.

I- Metabotropik glutamat reseptörleri: İkinci haberciler üzerinden dolaylı olarak iyon kanallarını kontrol eder. Metabotropik reseptörler GTP-bağlayıcı proteinlerle (G proteinleri) bağlantılıdır ve intraselüler mesajcılarının üretimini kontrol etmektedirler. Glutamat iyonotropik reseptörler üzerinden eksitasyon yaparken,

metabotropik reseptörler üzerinden eksitasyon veya inhibisyon oluşturabilmektedir (114,115,116).

II- İyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR): Doğrudan iyon kanallarını kontrol eder.

3 gruba ayrılır:

1. α -amino-3-hidroksi-5-metil izoksozole propionat (**AMPA**) tercih eden reseptörler
2. Kainat tercih eden reseptörler (**KAR**)
3. N-metil D-aspartat (**NMDA**) tercih eden reseptörler (114,115,116)

Bugüne kadar memeli SSS' inde 16 adet iGluR cDNA'sı ve 8 adet metabotropik glutamat reseptör cDNA'sı tanımlanmıştır. İzole edilebilen 16 adet iGluR cDNA'sının; 4 tanesi Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propionat reseptör (AMPA) subüniti (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4), 5 tanesi kainat reseptör subüniti (GluR5, GluR6, GluR7, KA1, KA2) ve 7 tanesi NMDA reseptör subunitidir (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A, NR3B)

2.4.2.1. NMDA Reseptörleri

NMDA RESEPTÖR TIPLERİ:

NMDAR' lerinin tanımlanan yedi tane subüniti vardır. Bunlar; NR1, NR2A-B-C-D ve NR3A-B (122). NMDAR'leri beynin tümünde yaygın olarak bulunurlar ancak baskın olarak ön beyine lokalize olmuşlardır. En yüksek düzeyde buldukları yer ise hipokampüsün CA1 bölgesidir (112).

NR1: 938 aminoasitten'ten meydana gelmiştir. 105,5 kDA ağırlığındadır. Glisin bağlayıcı bölgeyi içerir. NR1 reseptör subtip ekspresyonu SSS'de hemen hemen her yerde bulunmaktadır.

NR2: Glutamat bağlayıcı bölgeyi içerir. 4 grubu bulunur:

NR2A: 1464 aminoasitten meydana gelir ve 165.5 kDA ağırlığındadır. Ekspresyonu için yüzeyde NR1 N-terminalinin bulunması gereklidir. NR2A mRNA'sı

tüm beyinde yaygın olarak bulunur; fakat serebral korteks, hipokampus ve serebellumda daha yoğun olarak bulunmaktadır. Beyinde postnatal exprese edilir.

NR2B: 1482 aminoasitten oluşur ve ağırlığı 165,9 kDA'dır. Tüm embriyonik beyinde exprese edilir. Ayrıca embriyonik ve neonatal kardiyak myositlerde exprese edilir. Postnatal olarak yalnız ön beyinde exprese edilir. NR2B'nin ekspresyonu önbeyinde, serebral korteks, hipokampus, septum, kaudat ve putamende seçici olarak yüksek düzeyde bulunmaktadır.

NR2C: 1239 aminoasitten oluşur ve 135,4 kDA ağırlığındadır Postnatal olarak cerebellumda exprese edilir. Serebellumda dominant olarak bulunurken, talamusda ve olfaktor bulbusda daha az olarak bulunmaktadır.

NR2D: 1323 aminoasitten oluşur, 142,9 kDA ağırlığındadır. Diencephalon ve beyinsapında embriyonal ve neonatal olarak exprese edilir. Ortabeyin ve arkabeyinde yüksek iken; düşük düzeyleri talamusda, olfaktor bulbusda ve beyin sapında bulunmaktadır. NR2A ekspresyonunun tamamlayıcısıdır.

NR3: Silik fonksiyon gösterir. NR3A ve NR3B olarak iki tiptir. Ca^{+2} permeabilitesi yavaş ve uzun sürer. NR3A; Serebellum hariç korteks, hipokampus (CA1), ortabeyin, arkabeyin ve spinal kordda exprese edilir. Neonatal ekspresyonları çok güçlüdür, sonra azalmaya başlar (115,116).

İyonotropik glutamat reseptörleri sentetik agonistlere göre isimlendirilmişlerdir. NMDA glutamat reseptörleri 2-amino-5-phaphono valerik asit ile selektif olarak bloke olurken, AMPA ve kainat reseptörleri bu ajanla bloke olmazlar. Her iki reseptör de 6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3 dione ile bloke olurlar. Bu nedenlerde AMPAR ve KAR non-NMDA reseptörü olarak da isimlendirilmektedir. NMDAR agonistleri olan glutamat ve aspartat tipik olarak kısa zincirli dikarboksilik aminoasitlerdir ve kuvvetli excitatör nörotransmitterlerdir. Aspartat da glutamat gibi NMDA reseptörlerine bağlanır ve aktivite gösterir. Ancak AMPAR'leri ve KAR'lerine bağlandığında oluşturduğu etkiden daha az bir etki gösterir. NMDAR'leri ile AMPAR'leri ve KAR'leri arasında benzerlik azdır. AMPAR'leri ve KAR'lerinin kendi aralarındaki benzerlikleri daha çoktur. Genelde postsinaptik bölgeler hem AMPAR'ü hem de NMDAR'ü içerirken; bazı bölgelerde sadece NMDAR'leri bulunur. Gelişimin erken evresinde sinapslar sadece NMDA tipi reseptörler içermektedir (118,119). Non-NMDA iyonotropik

reseptörler motor nöronlarda ve beyinde eksitator postsinaptik potansiyel'in (EPSP) büyük erken komponentini oluşturmaktadır. Yani birçok sinapsta AMPAR'leri eksitator aşırım sırasında ana başlangıç; şarj edici gibi etki etmektedir. Bu reseptörler göreceli olarak düşük bir katyon iletkenliğine sahiptirler (< 20 pS). Na^+ ve K^+ 'a geçirgen iken Ca^{+2} 'a geçirgen değildirler. NMDAR'leri, intrasellüler enzimler ve ikincil mesajcılarının aktivelerini modüle edebilen katı bir Ca^{+2} componenti ile birlikte daha yavaş bir akım sağlamaktadır (116,120). EPSP'nin geç komponentini oluşturan NMDA reseptör kanallarının üç özelliği vardır.

1. Yüksek iletkenliğe sahip iyon kanallarını kontrol ederler ve Na^+ ve K^+ un yanısıra Ca^{+2} 'a da geçirgendirler.
2. 2-Kanalın açılması ko-faktör olarak glisin ekstrasellüler olarak bulunmasına bağlıdır. Kanal sadece glisin varlığında çalışır. Normal koşullarda ekstrasellüler glisin yoğunluğu NMDAR kanalının çalışabileceği miktarlarda bulunmaktadır. Kinürenik asit ve aminoksalinedikarboksilik asit'in her ikisinin çoğu türevleri glisin bölgesinin kompetitif antagonistleridir.
3. Açılması kimyasal haberciye bağlı olduğu kadar membran potansiyeline de bağlıdır. Bu özellik NMDAR'ları diğer voltaj kontrollü kanallardan ayıran bir özelliktir.

Voltaja bağımlılık diğer kanallarda olmayan farklı bir mekanizmadan kaynaklanmaktadır. Diğer kanallarda, membran potansiyelindeki değişiklikler, intrasek voltaj sensörünün sayesinde kanalda konformasyonel değişikliklere neden olurken NMDA ile aktive olan kanalda ekstrensek bloker olan Mg^{+2} (ekstrasellüler Mg^{+2}) açık olan kanalı kapayan bir tıkaç gibi davranır ve iyon akışına engel olur. İstirahat membran potansiyelinde (-65 mV'da) Mg^{+2} kanala sıkıca bağlanır. Ancak membran depolarize olduğunda (örneğin, non-NMDA reseptörleri glutamat ile aktive olduğunda), Mg^{+2} elektrostatik etkiyle kanaldan uzaklaştırılır ve Na^+ ile Ca^{+2} 'un geçişine izin verir. Bu nedenle NMDAR'lerinde en yüksek iyon akımı her iki koşulun da gerçekleşmesiyle ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle NMDAR'ü sinaptaki presinaptik aktivite ve postsinaptik depolarizasyonu eş zamanlı olarak saptayan bir araç gibi davranmakta ve postsinaptik hücreye yeterli miktarda ikincil haberci iyon olan Ca^{+2} 'un girişine imkan

vermektedir. Bu da sinaptik bağlantının kuvvetindeki plastik değişiklikleri başlatmaktadır (112,116,120).

Birçok hücrede hem non-NMDAR'ler hem de NMDAR'ler bulunmaktadır. Mg^{+2} , istirahat membran potansiyelinde NMDAR kanalını bloke ettiği için, NMDAR'lerinin EPSP'lerin oluşmasında önemli bir katkısı yoktur. Bu nedenle istirahat durumunda oluşan EPSP'lerde büyük oranlarda non-NMDA reseptörlerinin katkısı bulunmaktadır. Depolarizasyon arttıkça Mg^{+2} NMDAR kanalından uzaklaşmakta ve NMDAR'ü açılarak bu kanallardan iyon akışı gerçekleşmektedir (114,116). NMDAR kanalının diğer bir farkı göreceli olarak daha yavaş açılıp yavaş kapanması ve bu özelliği nedeniyle EPSP'lerin geç fazına katkıda bulunmasıdır. EPSP'nin geç fazı, Mg^{+2} 'un kanalı bloke etmesi nedeniyle, bir tek presinaptik sinyalden sonra zayıf bir cevap olarak karşımıza çıkmaktadır. Oysa presinaptik nöron ard arda sinyaller gönderirse postsinaptik hücrede EPSP'ler toplanarak 20 mV veya daha fazla bir depolarizasyon oluşturmaktadır. NMDAR'ü büyük ölçüde Ca^{+2} 'un katkısı ile daha büyük akımlara yol açmaktadır. NMDAR aktivasyonu sonucu, post-sinaptik hücrelerde, Ca^{+2} 'a bağımlı enzimler ve bazı ikincil haberciler devreye girmektedir. Bu reaksiyonlar, sinapsta bazı uzun vadeli modifikasyonlara katkıda bulunan sinyal yollarını tetiklemektedir.

Öğrenme ve bellekte sinapsta gerçekleşen değişikliklerin önemli olduğu düşünülmektedir. NMDAR'lerinin aktivasyonu presinaptik aktiviteye bağlı olduğu için ve uzun süreli sinaptik modifikasyonlar ile ortaya çıktığı için çoğu kez bu duruma aktiviteye-bağımlı sinaptik modifikasyonlar denmektedir (114,116).

Gen knockout teknikleri kullanılarak öğrenme ve hafızada rolü olan NMDAR'üne bağlı sinaptik plastisite keşfedilmiştir. Yapılan çalışmalar CA1 hipokampal NMDAR'ünün hipokampusa bağımlı spatial ve non-spatial hafızaların oluşması için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (118).

Öğrenmenin değişik formlarının meydana gelmesinde rolü olan hipokampusta sinaptik plastisitenin bir türü olan Long term potansiyalizasyon (LTP) öğrenme ve hafızanın nöronal mekanizmalarını araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (116,117). LTP sinaptik kuvvetteki aktiviteye bağımlı uzamış artış olarak tanımlanabilir

(120). Önceki çalışmalar hipokampal sinaptik plastisitenin LTP benzeri formlarının spatial öğrenme ve hafıza ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (116).

Hipokampusun CA1 bölgesindeki LTP'nin induksiyonu bir dizi olayı içermektedir. İlk olarak NMDAR kanalının presinaptik glutamat salınımına cevap olarak açılması için postsinaptik membranın yeterince depolarize olması gerekmektedir. Kanalın açılması postsinaptik hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun önemli derecede yükselmesine olanak vermektedir. Ca^{+2} 'daki bu artış metabotropik glutamat reseptörünün aktivasyonuna bağlı fosfoinozidit düzeylerindeki yükselmeyle birlikte proteinkinazların aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu proteinkinazlar daha sonra sinaptik kuvvette uzun süreli modifikasyonlara yol açacak proteinleri düzenlemektedirler (120,121).

NMDA RESEPTÖRÜNÜN YAPISI

NMDAR'lerinin NR1 subüniteleri ve beraberinde NR2 subünitelerinin en azından bir tipinden oluşan heteromerik yapılar olduğu kabul edilmektedir. NMDAR, AMPAR ve KAR subüniteleri 3 adet membrana uzanan domain içermektedir (M1, M3 ve M4). M2 domaini membrana sitoplazmik kenardan daldırılmış şekilde bir büklüm oluşturmaktadır. NR2 subünitelerinden gelen domainler glisin bağlanma bölgesini oluşturmaktadır(114,116,120).

NMDAR poru Ca^{+2} 'a yüksek derecede geçirgenlik sağlar ve Mg^{+2} ile bloke olur: NMDAR'ü voltaja bağımlı tek iyonotropik reseptördür. Normal miktarlarda Ca^{+2} bazı bellek tiplerinin oluşmasında gerekli sinyal yollarını tetiklemektedir. NMDAR'lerinin aktivitesi Mg^{+2} ile voltaja hassas blokajı ve Ca^{+2} 'a geçirgenliği pora uzanmış olan M2 segmentindeki aminoasit rezidülerine dayanmaktadır. Katyon seçiciliği M2 segmentinin kritik bir alanına (N alanı) dayanmakta, bu alan NR1 ve NR2 alt ünitelerinde bulunan bir asparajin rezidüsü tarafından oluşturulmaktadır.

NR2 alt ünitesi, membranın extrasellüler yüzünden gelen Mg^{+2} iyonları için temel bağlanma bölgesini içermektedir. Yani Mg^{+2} blokları M2'deki kritik asparajin rezidüleri veya onlara çok yakın olan aminoasit rezidülerinin etkileşimine dayanmaktadır. Bu bağlanma bölgesi; N bölgesi, yüksek Ca^{+2} geçirgenliği için kritiktir.

NR1 rezidüleri kanalın dış vestibülünü oluşturmaktadır. Bu vestibül M3 (C-terminal ucunda) ve M4 (N-terminal ucunda) segmentlerinin M1'den önce gelen parçaları tarafından oluşturulmuştur (114,116,120).

Bazı koşullar altında glutamat gibi eksitatör nörotransmitterlerin dengesizliği, bazı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Yüksek miktarlarda glutamat nöronlar için toksiktir. Beyindeki birçok hücrede L-glutamata yanıt veren reseptörler bulunmaktadır. Doku kültürlerinde ortama yüksek düzeyde glutamat eklenmesi birçok nöronu öldürmektedir, buna glutamat eksitotoksitesisi adı verilmektedir. Bir çok hücrede bu tür toksisite için NMDA tipi reseptörlerden Ca^{+2} 'un hücre içine girişi sorumlu tutulmaktadır. Yüksek intrasellüler Ca^{+2} , kalsiyuma bağlı proteazları ve fosfolipazları aktive ederek hücreye toksik olan serbest radikallerin oluşmasına yol açmaktadır. Ca^{+2} girişi ve eşlik eden NMDAR ilgisi ile özellikle AMPAR aktivasyonundan nöronal hasar ortaya çıkmaktadır. Bozulmuş Ca^{+2} homeostazı ile sonuçta enerji metabolizması hasar görmekte ve bazı kronik nörodejeneratif hastalıklar belirginleşebilmektedir (114,116,120).

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Üretim ve Deney Araştırma Laboratuvarı (HÜDAL), Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı, Biyofizik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

Kullanılan Malzemeler ve Aletler

- | | |
|-------------------------|--|
| 1- Soğutmalı santrifüj | : Eppendorf MR5415 (Almanya) |
| 2- Santrifüj | : Jouan B4İ (Fransa) |
| 3- Derin dondurucu | : Uğur (Türkiye) |
| 4- Hassas terazi | : Scaltec SPB 33 (İsviçre) |
| 5- Vorteks | : Nüve NM 100 (Türkiye) |
| 6- Otomatik pipetler | : Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa) |
| 7- Spektrofotometre | : Shimadzu UV 1601 (Japonya) |
| 8- pH metre | : Hanna Instruments (Portekiz) |
| 9- Manyetik karıştırıcı | : Nüve (Türkiye) |

3.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Üretim ve Deney Araştırma Laboratuvarında (HÜDAL) yetiştirilen, Wistar Albino cinsi, 210-254 gr ağırlığında 7-8 aylık, 32 adet dişi rat kullanıldı.

3.1.2. Çalışma Planı

Çalışma kapsamına alınan 32 rat 11-11-10 adet olacak şekilde, üç gruba bölündü ve tartılarak ağırlıkları belirlendi.

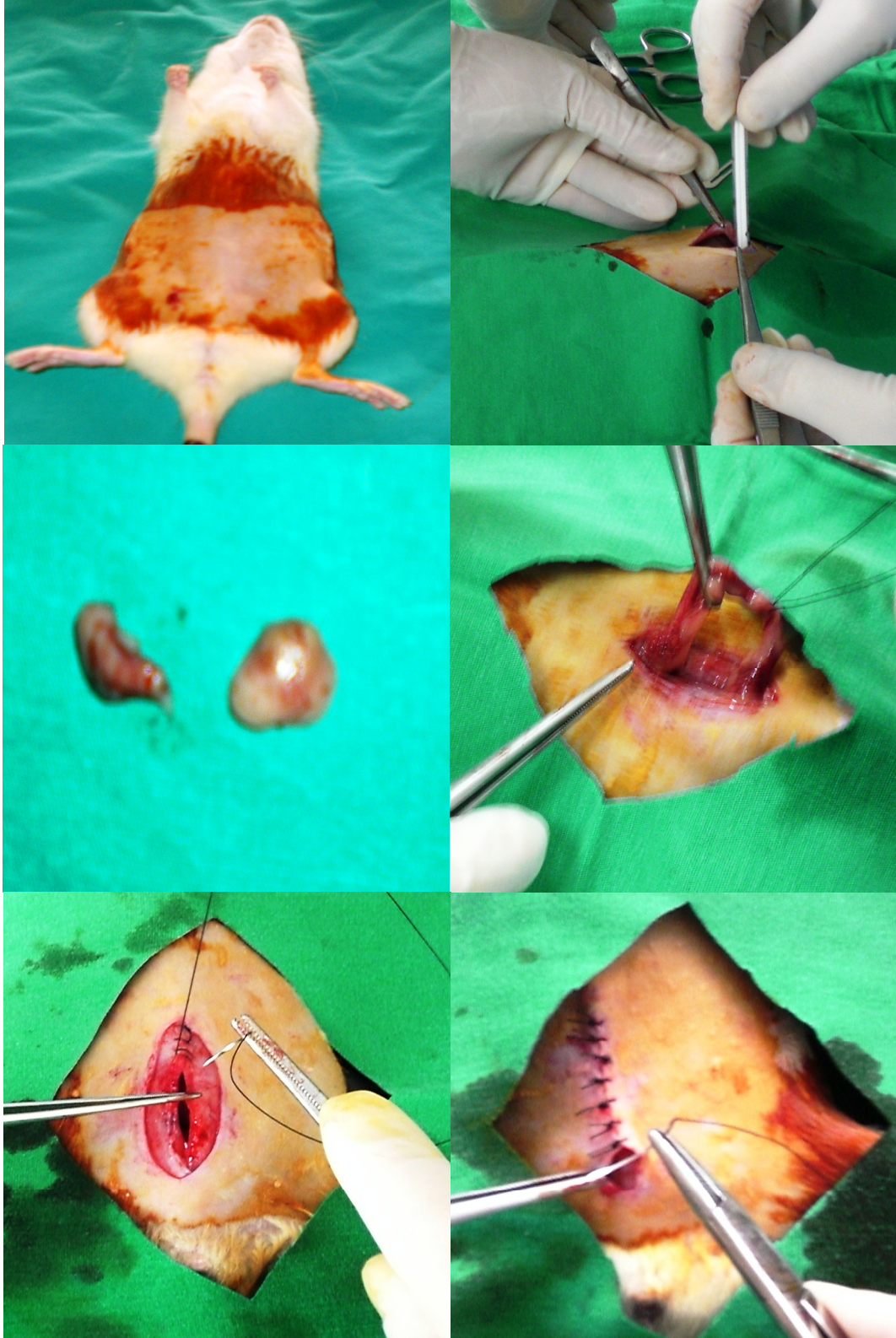
- 1) Overektomize +Melatonin grubu (O+MEL; n=11)
- 2) Overektomize grup (O; n=11)

3) Kontrol grubu (K; n=10)

Birinci gruba; Overektomi yanında,10 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal enjeksiyonla MEL,

İkinci gruba; Overektomi+0.12ml serum fizyolojik intraperitoneal

Üçüncü grup olan kontrol grubuna ise aynı süre boyunca 0.12 ml serum fizyolojik enjekte edildi.



Resim 1. Ratların overektomi görüntüleri

MELATONİN'İN HAZIRLANMASI: MEL (Sigma M-5250), DMSO içinde (10 mg/ml) çözüldükten sonra, günlük dozlar ayrı tüplere konuldu ve -20°C de dondurularak saklandı. Günlük doz, uygulamadan önce dondurucudan çıkarıldı ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra kullanıldı. Melatonin Uygulaması: 10mg/kg/gün yapıldı.

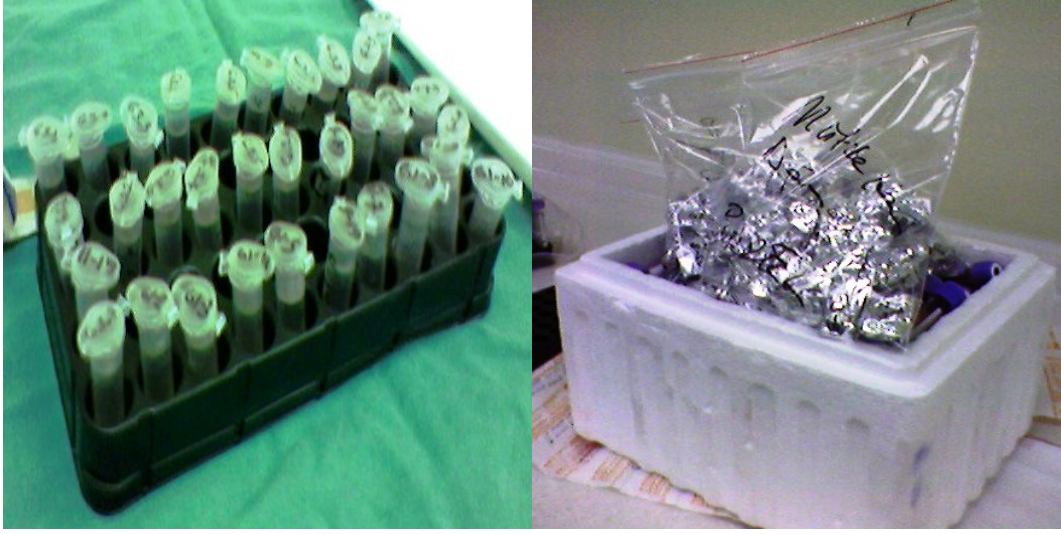
Ratlar 12 saat gece 12 saat gündüz ayarlı ortamda yeteri kadar (ad libitum) yem (Yem Kurumu Standart Pellet Sıçan Yemi) ve musluk suyu ile beslendi. Normal oda sıcaklığı (22 ± 1 °C) ve neminde tutuldu.

Tüm ratlara araştırmanın 30. gününde 12 saat açlığı takiben ketamine hydrochloride (50 mg/kg canlı ağırlığa) ve xylazine (5 mg/kg canlı ağırlığa) karışımının periton içerisine uygulanması ile anestezi yapıldı ve dekapite edilerek deney sonlandırıldı.

3.2. Metod

Ratlar dekapite edilerek öldürüldükten sonra beyinleri alındı. Filtre kâğıtları soğuk fosfat tamponuyla ıslatılıp buz paketleri üzerine konarak hipokampus çıkartma düzeneği oluşturuldu. Dekapitasyondan hemen sonra bu düzenek üzerinde hipokampuslar çıkarılarak önceden hazırlanmış 50 mM fosfat tamponu içeren ependorf tüplerine konuldu ve analizin yapıldığı tarihe kadar -20 °C'de Biyokimya laboratuvarında muhafaza edildi. Beyin dokusunun korteks kısımları ROS çalışılmak üzere Biyofizik Anabilim Dalı laboratuvarında analize kadar -80°C'de saklandı.





Resim 2. Hipokampus çıkartma düzeneği

3.2.1. Ros Çalışmaları

Korteks beyin örnekleri alındı. Bu korteks beyin örnekleri tartıldıktan sonra fosfat tamponu (50 mM, pH 7.4) ile sulandırıldılar. Daha sonra cam-cam parçalayıcı (Çalışkan Cam Teknik, Ankara) ile parçalanarak doku homojenatları hazırlandı. Bu doku homojenatları lipit peroksidasyon (MDA), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) analizlerin yapılması için 1 ay süre ile -26 °C de donduruldular.

Beyin örneklerinde lipit peroksidasyon tayinleri

Beyin homojenatlarında lipit peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi Placer ve ark. (1966) bildirdikleri yönteme göre thiobarbituric-asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas en gelişmiş spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapılmıştır. Bu metod şu esaslara dayanmaktadır;

0.25 ml doku homejanatı 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör 100 °C 20 dakika kaynar suda su banyosunda tutuldular. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 g de 5 dakika santrifüj edildiler. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1 cm ışık geçişine sahip 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundular. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1,1,3,3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı.

Değerler μ mol/gram protein olarak belirlendi. TBARS metodu hassas bir metot olmamasına rağmen lipid peroksidasyon ve reaktif oksijen türlerinin düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan yaygın ve güvenilir bir metoddur.

Beyin indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeylerinin belirlenmesi

GSH düzeyleri Sedlak and Lindsay (1968) bildirdikleri yöntemle göre spektrofotometre cihazı ile belirlenmiştir. GSH tayini için gerekli solüsyonlar;

- %10 triklorikasetik asit (TCA) solüsyonu

- Tris tamponu (0.4 M pH:8.9): 48.46 gram tris-hydroxymethyl-aminomethan'ın hidroklorik asit (HCl) ile pH 8.9 olacak şekilde 1 litrede çözülmesi ile hazırlanır.

- DTNB solüsyonu: 5,5-dithiobis-2 nitrobenzoik asit'in 25 etanolde çözülmesi ile elde edilir.

Deneyin yapılışı: 0.1 ml doku homejanatı 0.4 ml TCA solüsyonu ile karıştırılır. 20 saniye karıştırıcıda vortekslenir ve 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edilir. 0.1 ml süpermatant temiz bir tüpe alınır. Üzerine 0.9 ml distile su, 2.0 ml Tris tamponu ve 0.1 ml DTNB solüsyonu eklenir. Oluşan sarı renk distile suya karşı 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunur.

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitelerinin belirlenmesi

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (1976)'un bildikleri yöntemle göre spektrofotometrede belirlendi.

Kullanılan kimyasallar

1- Tris HCl tamponu (50 mM) pH:7.6

2- GSH solusyonu

3- CHPO (cumene-hydroperoxide) solüsyonu

4- %10 TCA solüsyonu

5- Tris tampon 0.4 M pH: 8.9

6- DTNB solüsyonu

Deneyin yapılışı

Kimyasallar	Kontrol	Örnek
Doku homejanatı	0.5 ml	0.5 ml
Tris HCl tamponu	0.3 ml	0.3 ml
CHPO	-	0.1 ml
GSH (her tüpe 5 er sn aralılarla konuldu.)	0.1 ml	0.1 ml
Oda ısısında tam	10 dakika	beklendi.
TCA (her tüpe 5 er sn aralılarla konuldu)	1.0 ml	1.0 ml
2500 rpm de	5 dakika	santrifüj edildi
Üstteki süpernatant	temiz bir	tüpe alındı.
Üzerine Tris Tampon	2.0 ml	2.0 ml
DTNB	0.1 ml	0.1 ml

Oda ısısında 5 saniye beklendi. Distile su örneği kör kabul edilerek 412 nm de spektrofotometrede aynı örneğin yukarıdaki tabloda bahsi geçen hem kontrol ve hem de örnek okundu.

3.2.2. Hipokampüs Örneklerinin Homojenizasyonu

Hipokampuslar önce tartıldı. Hipokampüsün bir yarısı lipid peroksidasyon ürünleri çalışılmak üzere ayrıldı. 1/5 oranında homojenizasyon tamponu (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 8 mM MgCl₂, 5mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 0.01 mg/ml leupeptin, 0.01 mg/ml aprotinin 250 mM NaCl) homojenize edildi. Hipokampüslerin diğer yarısı SDS-PAGE ve Western Blot prosedürü uygulanmak üzere ayrıldı. Tartılan hipokampuslar her grupta 3 numune olacak şekilde birleştirildi ve 1/4 oranında homojenizasyon tamponu ile karıştırılarak homojenize edildi. İlk adımda buz üzerinde teflon-cam homojenizatör ile 18-20 darbede homojenize edildi. İkinci adımda 30 sn. buz üzerinde sonike edilerek homojenizasyon tamamlandı. Homojenize edilen örnekler 15000 g'de +4°C'da soğutmalı santrifüjde 20 dk santrifüj edildi. Homojenize edilen örneklerin süpernatantlarında Lowry yöntemi kullanılarak protein tayini yapıldı (124).

SDS-PAGE Yöntemi

Laemmli'nin yöntemi esas alınarak çalışıldı (123). % 7.5'lik lower gel ve % 4'lük upper gel hazırlanıp, kuyucuk başına son konsantrasyonu 50 µgr protein olacak şekilde doku homojenatı sample buffer'la 1/1 oranında karıştırılarak uygulandı.

Western Blot Yöntemi

SDS-PAGE prosedürü ile örnekler jel üzerinde proteinlerine ayrıldıktan sonra elektroforetik olarak polyvinylidene difluorid (PVDF) membrana (immobilon-P) transfer edildi. Transfer sonrası membran %1 BSA içindeki anti-NR2A(1:3000) ve anti-NR2B (1:1000) antikorları ile gecelik inkübasyona bırakıldı. %3 BSA içeren TTBS içerisinde 30 dk inkübe edildi. TTBS ile 10 dk'lık 3 yıkamadan sonra oda ısısında 1 saat HRP (Horse radish peroksidaz) konjuge anti-rabbit IgG (1:5000) ile inkübe edildi. 3 defa TTBS ile yıkandıktan sonra, Pierce ECL plus (elektro kemoluminesans saptama kiti, Pierce, USA) solüsyonu ile bantların görüntüleri elde edildi. Bantlar Kodak Image 2000MM Station (USA) cihazında taranarak yoğunlukları ölçüldü.

3.2.3. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [mean \pm standard deviation (SD)] olarak verildi. Ratlardan elde edilen biyolojik materyalde çalışılan parametrelerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS (Windows 15.0 paket) bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Genel olarak gruplar arası fark olup olmadığı Kruskal Wallis Varyans Analizi ile değerlendirildi. Canlı ağırlık artışları Wilcoxon Signed Ranks testi ile değerlendirildi. Tüm istatistikî karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Rat Ağırlıkları

Başlangıçta maksimum: 254,00 gr ve minimum: 205,00 gr ortalamaları: 226,06 gr olan 32 adet Wistar Albino dişi rat alınarak çalışmaya başlandı.($p>0.05$)

Çalışmanın başlangıcında ve bitiminde ölçülen rat ağırlıklarının ortalamaları Tablo 4 de gösterilmiştir.

Tablo 4. Ortalama rat ağırlıkları

GRUPLAR	RAT AĞIRLIKLARI (ortalama gram)	
	İLK ÖLÇÜM	SON ÖLÇÜM
MEL+OV (n=11)	228,00	254,00
OV (n=11)	224,00	245,00
KONTROL (n=10)	228,00	233,00

MEL+OV grubundaki ratlar kendi ağırlıklarının %11.4'ü kadar kilo artışı gösterirken,sadece overektomize yapılan gruptaki ratlar kendi ağırlıklarının % 9.3'ü kadar kilo artışı göstermişlerdir. Kontrol grubu ratlarda ise kendi ağırlıklarının %2.1'i kadar kilo artışı görülmüştür.

Melatonin verilen 1.grupta ilk ölçüm en az: 210,00 gr en çok: 245,00 gr ortalama 228,00 gr iken son ölçüm 254,00 gr(en az:220,00 gr- en çok: 302,00 gr) olup Wilcoxon Signed Ranks Testine göre $p:0.012$ olup anlamlı kilo artışı izlenmiştir.

Yalnızca overektomize yapılan 2.grupta ilk ölçüm ortalama 224,00gr (en az:205,00 gr-en fazla:254,00 gr), son ölçüm ortalama 245.00 gr (en az:210,00 gr-en fazla:289,00gr) olup Wilcoxon Signed Ranks Testine göre $p:0.016$ yani istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Kontrol grubunda ise ilk ölçüm ortalama 228,00 gr (en az:215,00 gr-en çok:252,00gr), son ölçüm ortalama 233,00gr (en az:210,00gr- en çok:259,00gr) olup $p:0.16$ olup istatistiksel anlamlılık yoktur.

4.2. Ros Ölçümleri

Çalışma gruplarının beyin dokusu MDA, GSH-Px ve GSH ölçümleri Tablo 5’de gösterildi.

Tablo 5. Beyin dokusunda MDA, GSH-Px ve GSH düzeylerinin gruplara göre dağılımı

Parametreler	MEL+OV			OV			KONTROL		
	min	max	ort	min	max	ort	min	max	ort
MDA ($\mu\text{mol/gr doku}$)	2.39	3.48	2.86	2.39	4.46	3.33	2.17	4.13	2.89
GSH-Px (IU/gr doku)	2.01	3.75	2.88	2.64	3.99	3.37	2.39	3.66	3.29
GSH ($\mu\text{mol/gr doku}$)	1.11	2.18	1.47	1.18	1.77	1.34	1.21	2.25	1.87

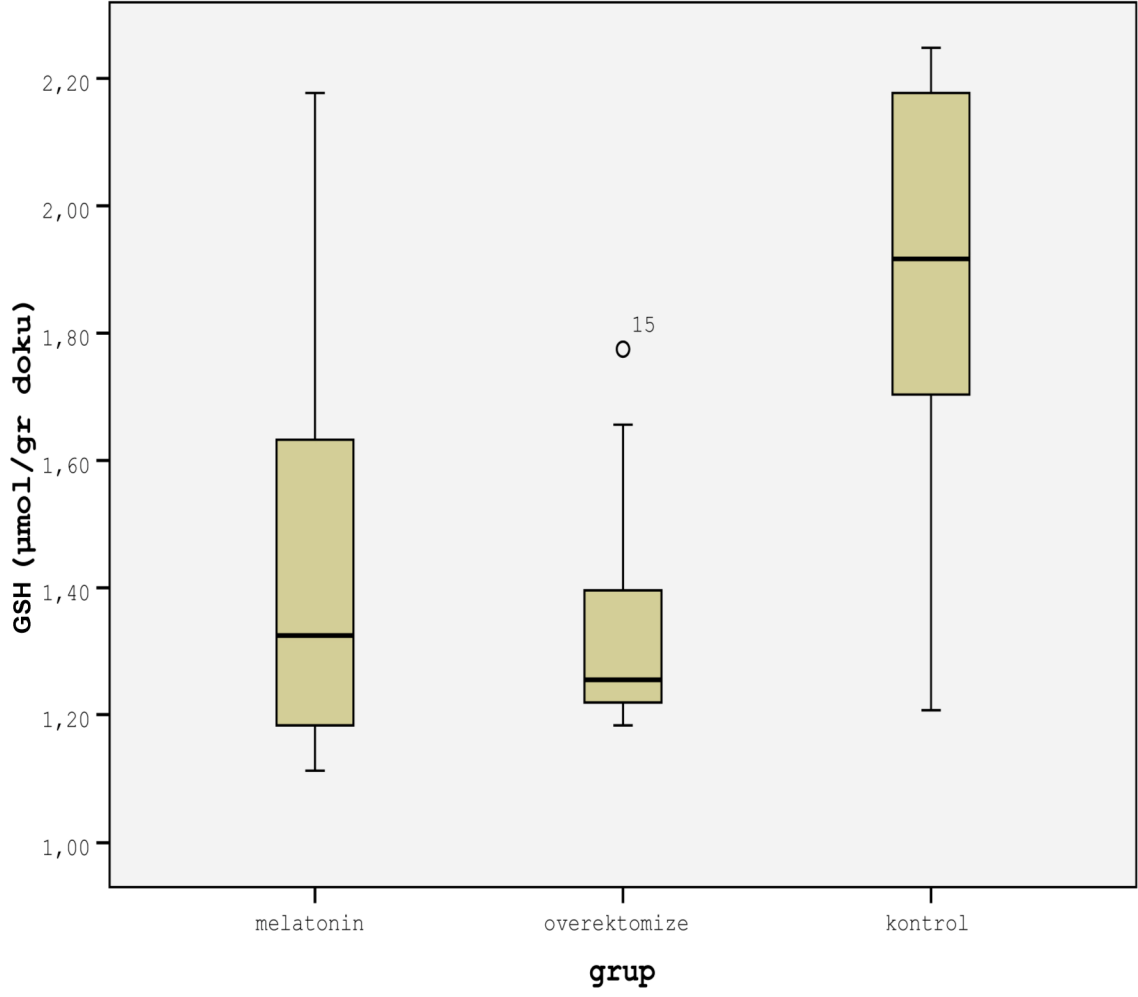
Tablo 6. Çalışma grupları beyin dokusu ortalama MDA, GSH-Px, GSH düzeyleri (Ortalama \pm SD)

GRUPLAR	MDA ($\mu\text{mol /gr doku}$)	GSH-Px (IU/gr doku)	GSH ($\mu\text{mol /gr doku}$)
MEL+OV (n=11)	2.86 \pm 0.34 ^a	3.39 \pm 0.48	1.47 \pm 0.35 ^a
OV (n=11)	3.33 \pm 0.75*	3.37 \pm 0.41	1.34 \pm 0.20*
KONTROL (n=10)	2.89 \pm 0.72	3.29 \pm 0.36	1.87 \pm 0.34

*p<0.05 kontrol grubuna kıyasla. ^ap<0.05 OV grubuna kıyasla.

GSH ÖLÇÜMLERİ

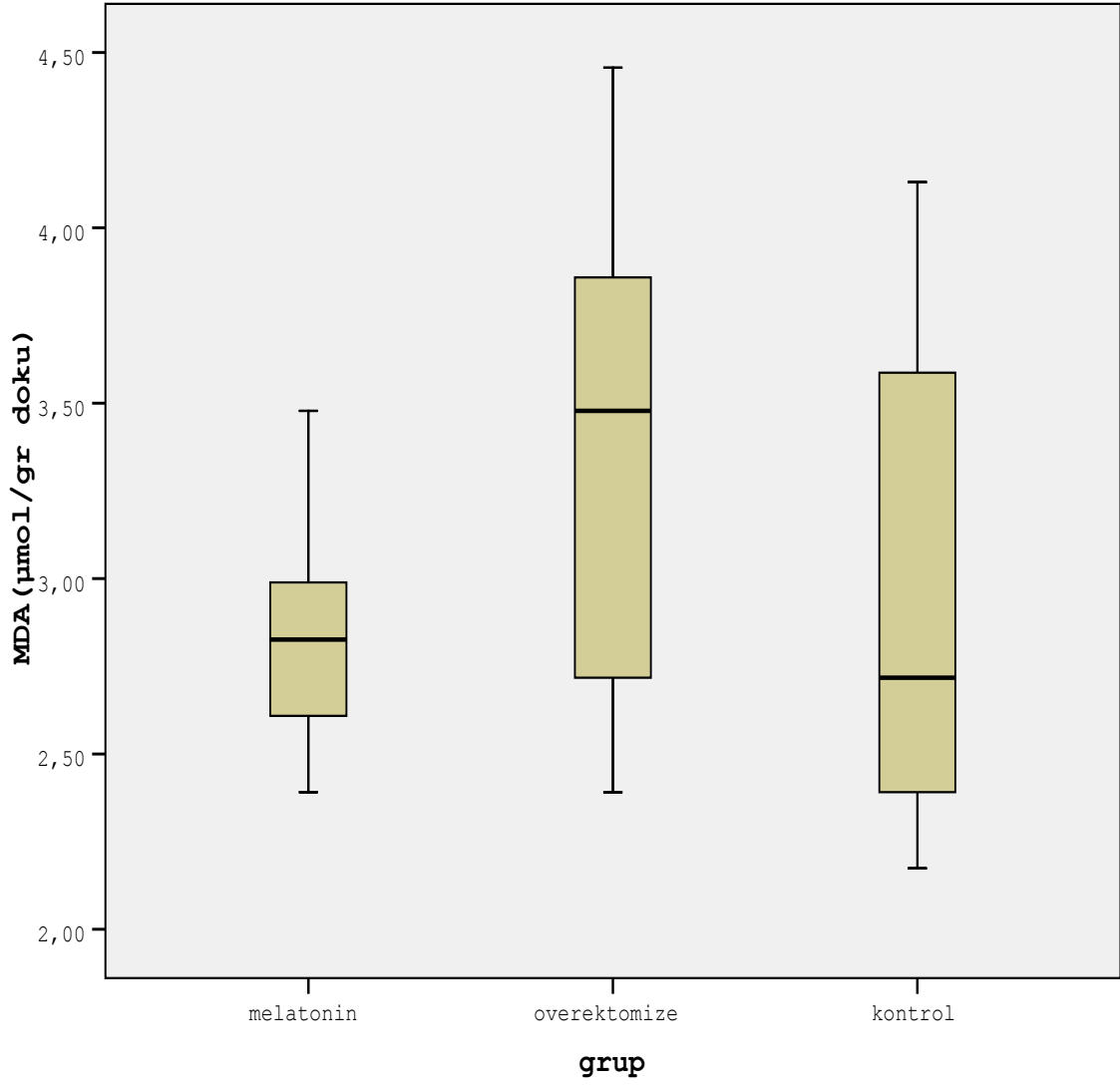
Beyin dokusu GSH ölçümleri her 3 grupta Kruskal Wallis Testi ile değerlendirildiğinde p=0,007 (p< 0,05) olup istatistiki olarak anlamlıdır. GSH kontrol grubunda MEL + OV ve sadece OV grubuna göre yaklaşık iki kat artış göstermiştir. Bu anlamlılığın hangi iki grup arasında olduğunu tespit etmek için Kruskal Wallis testinin bir alt grubu olan Mann-Whitney testi uygulandı. MEL-OV grubu karşılaştırıldığında p=0,76 olup anlamsız, MEL-K grubunda p=0,017 anlamlı, OV-K grubunda p=0,003 olup anlamlıdır (Şekil 13).



Şekil 13. Gruplar arası GSH grafiği

MDA ÖLÇÜMLERİ

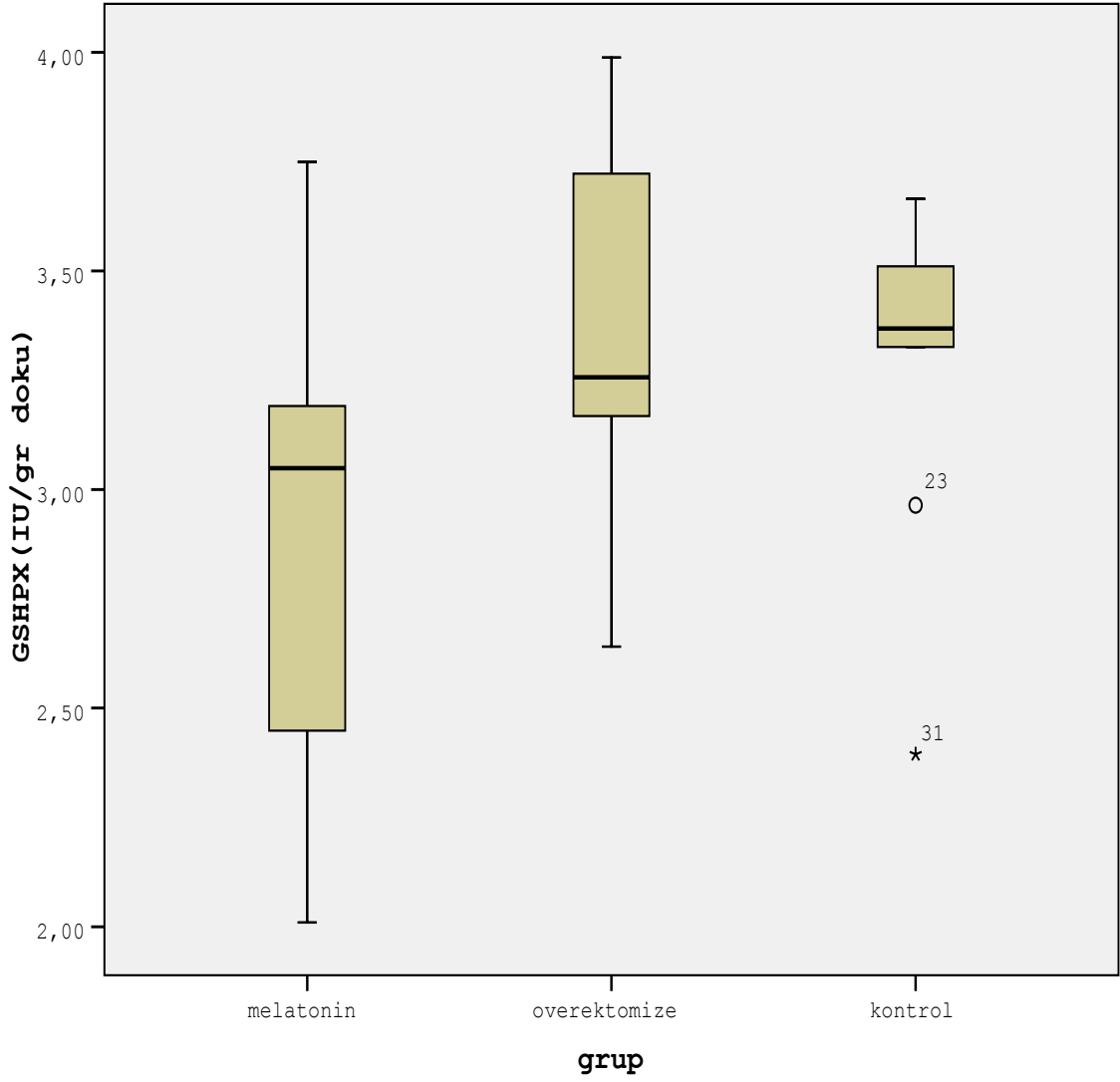
Çalışma gruplarının doku MDA aktiviteleri 3 grup arasında karşılaştırıldığında $p=0,21$ ($p>0,05$) olup anlamsızdır (Şekil 14).



Şekil 14. Gruplar arası MDA grafiği

GSH Px ÖLÇÜMLERİ

Çalışma gruplarının doku GSH-Px aktiviteleri arasında karşılaştırma yapıldığında gruplar arası anlamlı fark olmadığı görüldü ($p=0,084$) (Şekil 15).



Şekil 15. Gruplar arası GSH-Px grafiği

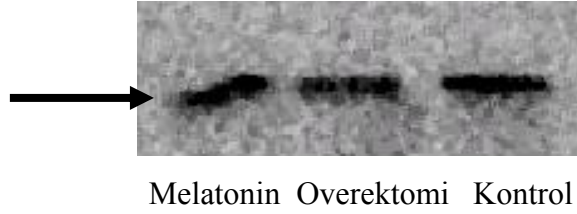
4.3. Hipokampus NMDA Reseptör Ölçümleri

Tablo 7. Tüm gruplarda NR2A, NR2B reseptör yoğunlukları ortalama ve \pm SEM değerleri

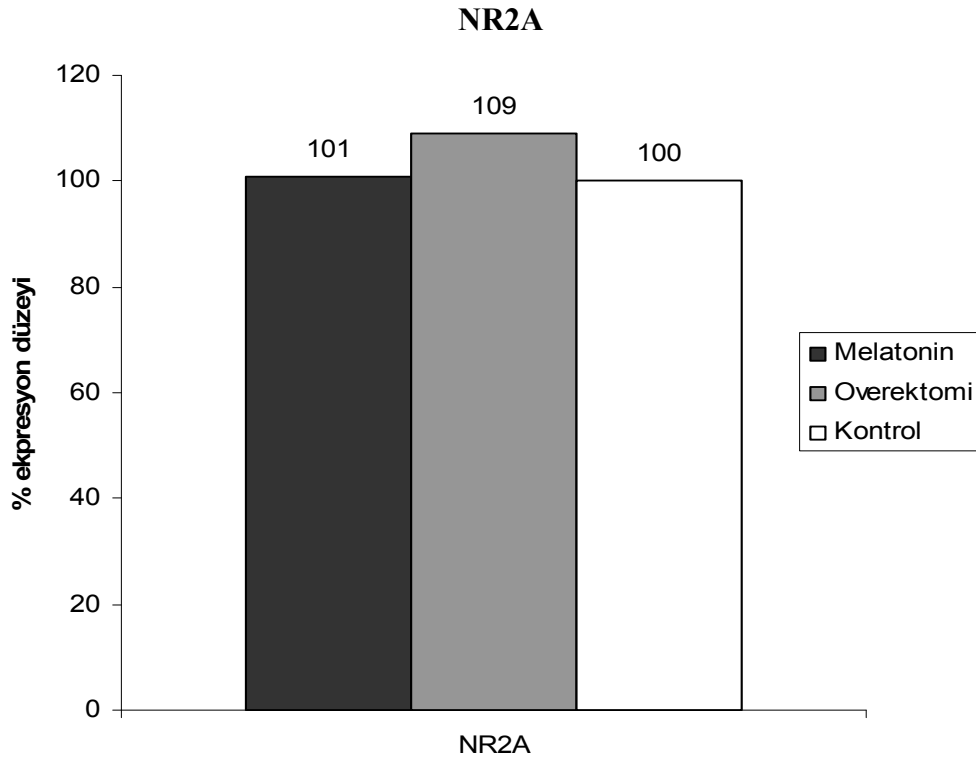
Gruplar	NR2A (optik dansite)	NR2B(optik dansite)
MEL+OV (n=11)	101.33 \pm 14	130.66 \pm 25
OV (n=11)	109.00 \pm 34	84.33 \pm 4
KONTROL (n=10)	100.00 \pm 5	100.00 \pm 2

4.3.1. NR2A Ölçümleri

NR2A reseptör analizi sonucu kontrol grubuna göre melatonin+overektomize grupta % 1'lik bir artış, yalnızca overektomize yapılan ikinci grupta %9'luk bir artış olmasına rağmen her 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı. ($p > 0.05$) (Tablo 7)



Resim 3. Hipokampus örneklerinden Western Blot yöntemi ile elde edilen bantların NR2A'ya ait görünümü



Şekil 16. NR2A'ya ait Western Blot örneği

Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip kontrole göre % konsantrasyon değeri olarak verilmiştir. Kontrol grubuna göre MEL + OV grubunda % 1'lik bir artış, OV grubunda ise % 9'luk bir artış görüldü ($p > 0.05$) (Şekil 16).

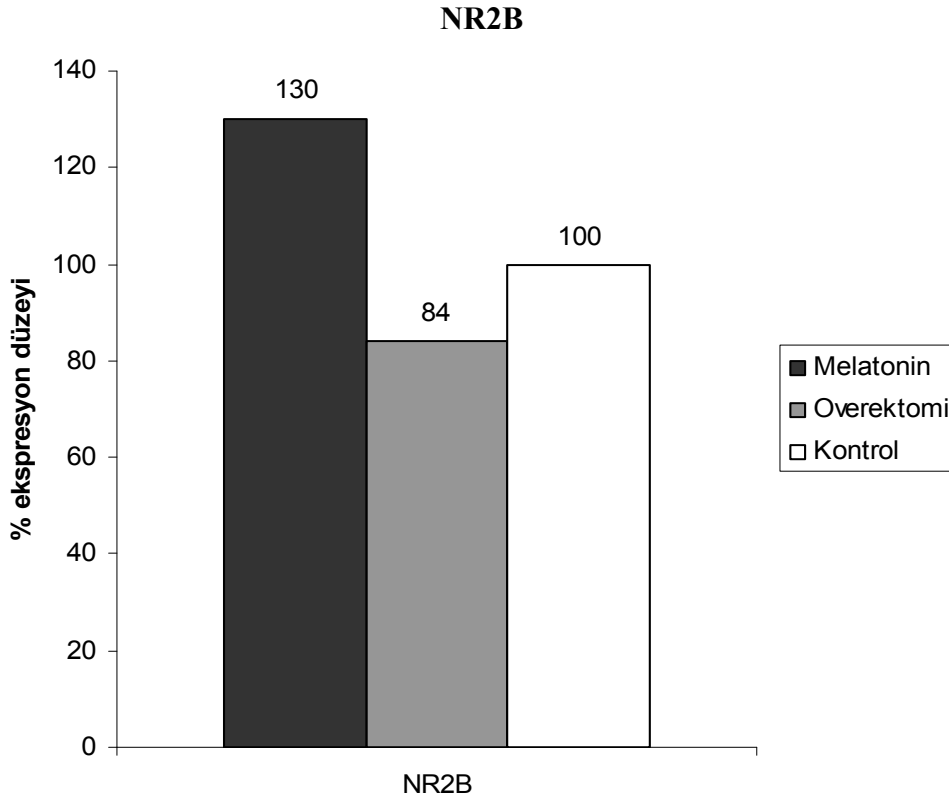
4.3.2. NR2B Ölçümleri

NR2B reseptör analizi sonucu kontrol grubuna göre melatonin+overektomize grupta % 30'luk bir artış, yalnızca overektomize yapılan ikinci grupta %16'lık bir azalma görüldü. 3 grup arasında Kruskal-Wallis testi ile yapılan karşılaştırmada $p<0,05$ olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. (Tablo 7)



Melatonin Overektomi Kontrol

Resim 4. Hipokampus örneklerinden Western Blot yöntemi ile elde edilen bantların NR2B'e ait görünümü



Şekil 17. NR2B'ye ait Western Blot örneği

Sonuçlar kontrol grubu 100 kabul edilip kontrole göre % konsantrasyon değeri olarak verilmiştir. Kontrol grubuna göre MEL + OV grubunda % 30'luk bir artış, OV grubunda ise % 16'lık bir azalma görüldü ($p<0,05$) (Şekil 17).

5. TARTIŞMA

Östrojenin doğal bir antioksidan olduğu ve radikal-temizleyici özellikler sergilediği (131,136), vasküler düz kas hücre membran fosfolipidlerini peroksidasyona karşı koruduğu(133), yetersizliği durumlarında lipoproteinlerinin oksidasyonunun artışı ile kalp-damar hastalıklarına neden olduğu (37), şok ve beyin dejenerasyonu geçirme riskinin arttığı, kanser oluşumuna zemin hazırladığı çok iyi bilinmektedir (134). HRT tedavileri bu eksiklikleri gidermek için kullanılmasına rağmen kanser oluşumuna neden olması menopozdaki kadınların kullanmak istememeleri gibi olumsuzluklara sahiptir. Melatonin pineal bezden salgılanan bir hormon olup kuvvetli antioksidan özelliğe sahiptir. Hatta diğer kuvvetli antioksidanlardan (vitamin C ve E) daha kuvvetli antioksidan özelliğe sahip olduğuna dair bildirimler mevcuttur (102-104). Yaptığımız literatür taramalarında beyin oksidatif stres ve NMDA reseptörleri üzerinde melatonin etkisinin araştırıldığı hiçbir kaynağın bulunmadığını gözlemledik. Bu nedenle, biz ihtisas projesi çalışmamızda, HRT'ye alternatif tedavi olarak melatonin uygulanmasının beyin oksidatif stres ve NMDA reseptörleri üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda, overektomize ratlarda oksidatif stresin arttığını, GSH ve NMDA reseptör düzeylerinin azaldığını gözlemledik.

İnsan vücudunda karbonhidratların, protein ve yağların mitokondride değerlendirilmeleri ve fagositoz gibi fizyolojik olaylar ve iskemi, hemoraji, travma ve radyoaktivite gibi patolojik olaylar sırasında reaktif oksijen türleri ismi verilen ürünler meydana gelmektedir. Bunların başlıcaları; süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit radikali (H_2O_2), hidroksil radikalidir (OH^\cdot). Bu ürünler özellikle doymamış yağ asitlerinin yapılarını bozmaktadırlar (72,73). Bu radikalların zararlı etkilerinin dolaylı yoldan hücre düzeyinde belirlenmesinde kullanılan yöntem malonildialdehit (MDA) esasına bağlı lipid peroksidasyon düzeyi tayinidir. Bunların vücuttaki zararlı etkilerinin önlenmesinde antioksidanlar rol oynamaktadır. Antioksidanları başlıca iki gruba ayırmak mümkündür. Birincisi enzimatik antioksidanlar olup süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz gibi enzimleri içermektedir. SOD enzimi süperoksit radikalini dismute ederek hidrojen peroksit üretmemektedir. SOD zararlı bir iş yapıyor gibi görünmemektedir. Fakat CAT ve GSH-Px enzimleri hidrojen peroksiti suya parçalamalarından dolayı SOD süperoksit radikalini bu enzimlerin

parçalayabileceği şekle dismüte etmektedir. Başka bir çalışma da Cu/Zn SOD'un aşırı üretilmesinin GSH-Px neden olduğu beyin mitokondriyal respiratuar disfonksiyonunu önlediğini bildirmiştir (70). Dahası, SOD'un aşırı üretilmesinin organizmalara ilave koruma sağlamak yerine beyin hasarına yol açtığı ve ömrü uzatmadığı bildirilmiştir. Serbest radikallerin menopozal durumda önemli bir rolleri olduğu göz önüne alınırsa, estradiol ve progesteron hormonlarının SOD aktivitesini hafifletmek suretiyle çeşitli dokularda bu yaşlanma süreçlerini geciktirebileceği ya da geriletebileceği sonucuna varılabilir. Sonuçlar ovaryan steroid hormonlarının özellikle kombine tedaviyle, yaşlı dişi ratların çeşitli dokularındaki sitozolik SOD aktivitesini hafifletebileceğini düşündürür. Sonuç olarak yaşlanmakta olan ratlarda HRT azalmış aminoasit transaminasyonu eşlik eden proteoliz ve oksidatif stresi azaltır, bu nedenle yaşlanma sürecini yavaşlatır ve dolaylı olarak da yaş-ilişkili bozuklukların başlangıcını geciktirir.

İkinci grup antioksidanlar enzimatik olmayan antioksidanlardır. Bu grup içerisinde başlıca yağda eriyen A, E, C vitaminleri, eritropoietin ve melatonin girmektedir. Örneğin, E vitamini yapısında bulundurduğu hidrojen iyonlarını hidroksil radikallerine vermekte ve bu sayede hidroksil radikallerini inhibe etmektedir. E vitamini kendisi radikal haline dönüşmekte ve E vitamininden radikalleri C vitamini ile glutatyon (GSH) temizlemektedir. Bu sayede C vitamini ve GSH, E vitamininin rejenerasyonunu sağlamaktadırlar (125).

Melatonin DNA'yı, lipidleri ve proteinleri serbest radikal hasarından koruyan bir antioksidandır. Melatonin yalnızca superoksit radikalleri ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikalleri temizlemekle kalmaz, aynı zamanda CAT, GSH-Px ve SOD gibi antioksidan enzimleri aktive eder (141-143). Cugini ve arkadaşları melatoninin SOD açısından mRNA seviyelerini artırdığını bildirmişlerdir (144). Hafıza ve öğrenme bireylerde yaş-ilişkili nörodejeneratif hastalıklarla birlikte bozulur; bunun, kısmen, aşırı reaktif oksijen türlerinin oluşumunun bir sonucu olduğuna inanılır. Beyin göreceli yüksek oksijen radikalleri oluşumunun neden olduğu oksidatif strese, kolayca oksidize edilebilir lipidlerin yüksek konsantrasyonlarda bulunmasına ve antioksidatif savunma sisteminin göreceli kaybına karşı savunmasızdır (145). Delibaş ve arkadaşları endojen melatonin etkilerini inceledikleri çalışmada karanlıkta tutulan ratların hipokampuslarındaki NR2A ve NR2B reseptör konsantrasyonlarının kontrol grubu ve fonksiyonel pinealektomili (kontinu ışık maruziyeti) gruplara kıyasla önemli derecede

artış gösterdiğini rapor etmişlerdir. NMDAR konsantrasyonları ciddi derecede yükselirken lipid peroksidasyonunda anlamlı değişiklik saptamamışlardır (2). Pelmar ve arkadaşları ise hipokampal parçaların yüksek konsantrasyonlarda hidrojen peroksit ile uzun süreli inkubasyonunun LTP'nin tam ekspresyonunu önlediğini bildirmişlerdir (150). Dahası yükselmiş MDA seviyelerinin serbest radikal aracılı doku hasarını gösterdiği bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu SSS'deki poliansature yağ asitlerinin yüksek konsantrasyonları nedeniyle beyinde daha fazla hasar verici bir süreçtir (151). Sonuç olarak LTP ekspresyonu için bir nöron hücresinde belirli serbest oksijen radikal miktarının olması gerekir, ancak serbest radikal nedenli doku hasarının bir markerı olan MDA'nın seviyelerinin normal aralıklarda olması gerekir. Sütçü ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, overektomize sıçanlarda NR2A ve NR2B ($p<0.05$) düzeylerinde bir azalma, MDA düzeylerinde ise bir artış saptamışlardır. Bununla beraber, melatonin verilen gruplarda NR2A ve NR2B ($p<0.05$) düzeylerinde bir artma, MDA düzeylerinde ise bir azalma belirlemişlerdir ($p<0.05$). Sonuç olarak; NMDA reseptörlerindeki değişiklikleri overektomize grupta oksidatif stres artışına, melatonin verilen grupta ise melatoninin serbest radikaller üzerindeki inhibe edici etkisine bağlamışlardır.

Melatonin kan beyin bariyerini kolayca geçer, hücrelere ve subsellüler kompartmanlara girer (153). Melatonin bütün subsellüler kompartmanlardaki makromolekülleri oksidatif hasara karşı korur (154). Shen ve arkadaşları ise melatoninin kognitif fonksiyonları düzeltmedeki etkisinin antioksidan hareketleriyle ilişkili olduğunu kabul etmişlerdir (151). Argyriou ve arkadaşları melatoninin kognitif süreçteki olası ilişkisini incelemişler ve bu amaca yönelik melatonin ve luzindolü tek başına ya da kombine olarak santral yoldan enjekte ederek olfaktor, sosyal hafıza testini kullanarak kısa-süreli hafıza üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve endojen melatoninin kısa-süreli hafızayı iyileştirdiğini göstermişlerdir (156). El-sherif ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada melatoninin hipokampusta hafıza oluşumunu etkileyebileceğini göstermişlerdir (155).

Brawn ve arkadaşları melatonin salgılanmasının yaşla birlikte genç insanlardakinin yaklaşık yarı değerine düştüğünü göstermişlerdir (157,158). Bununla birlikte Touitou ve arkadaşları ise 70-90 yaşları arasındaki bireylerin %33'ünde gençlerle benzer melatonin değerler, %53'ünde azalmış ve %14'ünde ise artmış

değerler saptamışlardır (159). Liu ve arkadaşları Alzheimer hastalarında yaşlılarına oranla daha az seviyede melatonin bulunduğunu göstermişlerdir (161).

Sirkadyen melatonin paterninin desenkronizasyonu birçok psikiyatrik bozuklukta ve birkaç zaman bölgesi geçen hava yolcularının yaşadığı Jet lagda sorumlu tutulmuştur (163). Vardiyalı işte çalışan insanlar gece çalıştıkları mesleklerini bıraktıktan 10 sene sonra bile ciddi uyku bozuklukları çekerler. Bununla ilgili çalışma yapan Folkard ve arkadaşları melatoninin gece vardiyası çalışanlarının toleransını artırdığını gözlemlemişlerdir (162).

Bulimiyalı hastalarda (165), nevralsjili (166) veya fibromiyalji (167,169) hastalarda, küme (cluster) tipi baş ağrısı olan (169) ve koroner kalp hastalığı olan (170) hastalarda azalmış melatonin seviyeleri vardır. Petranka ve arkadaşları melatoninin onkostatik etkisini kanıtlamışlar (171,172). Eren ve arkadaşları ise kutup çemberi etrafındaki ülkelerde depresyonda bir artış ve çeşitli kanserlerde azalma bildirmişlerdir (173). Melatoninin romatizmal artritte koruyucu bir etkisi vardır (174). Cagnati ve arkadaşları da postmenopozal kadınlarda melatonin uygulamasının kan glukoz konsantrasyonlarını artırdığını rapor etmişlerdir (175). Biz de HRT alamayan veya almak istemeyen postmenopozal kadınlarda melatoninin alternatif bir tedavi olup olamayacağını araştırmak istedik.

Çalışmalarımızın sonucunda beyin korteks lipid peroksidasyon düzeylerinin (MDA) kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde yüksek olduğunu gözlemledik. Literatürde hem deney hayvanlarında hem de insanlarda menopoz etyopatogenezinde oksidatif değişiklikler ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır. Nazıroğlu ve arkadaşları diyabetik ve diyabetik olmayan postmenopozal kadınlarda plazma ve alyuvar MDA düzeylerini kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (126). Mevcut çalışmamızdaki oksidatif stres sonuçlarıyla uyumlu olarak, Kwok-Keung Lam ve arkadaşlarının overektomize ratlarda izole aort segmentleri üzerinde yaptıkları çalışmada overektomi işleminin aortik dokudaki O_2^- üretimini önemli oranda artırıp, plazma NO metabolit seviyelerini azaltırken östrojen tedavisi bu etkileri önemli ölçüde önlemiştir (138). Lam KK ve arkadaşları 2006'da yaptıkları çalışmada overektomize ratlarda östrojen tedavisinin oksidatif stresi azalttığını ve vasküler tetrahidrobiopterini takviye ettiğini göstermişlerdir. Östrojen tedavisinin vasküler tetrahidrobiopterinin

(BH4) O_2^- üretimini zayıflatma uygunluğunu artırdığını ve total antioksidan kapasiteyi onararak overektomize ratlarda iyileşmiş NO-aracılı vazodilatasyona yol açtığını saptamışlardır (137). Yine benzer şekilde Guevara-Guzman ve arkadaşlarının 2009'da overektomize dişi ratlarda ozon uygulanmasına bağlı olarak serbest radikallerin üretiminin arttığı, östrojen verilmesi ile de serbest radikal düzeylerinin azaldığı rapor edilmiştir (139). Ceylan-Işık ve ark. aortada diyabetik ve diyabetik olmayan overektomili gruplarda artmış olan malondialdehit konsantrasyonunun östrojen tedavisiyle düşürüldüğü, uterusu ise tedavinin diyabetik durumda malondialdehit konsantrasyonunu azaltırken, sadece overektomi yapılan hayvanlarda artırdığını rapor etmişlerdir. Östrojen tedavisinin, aortada artmış olan glutatyon peroksidaz ve katalaz aktivitelerini düşürdüğü, uterusu ise artırdığına değinmişlerdir. Bu araştırmacılar, tedavinin doku çeşidine göre prooksidan ya da antioksidan gibi davrandığını gösterdiği sonucuna varmışlardır (140).

Bizim çalışmamızda beyin korteks, GSH düzeylerinin overektomize grupta önemli düzeyde azaldığı gözlemlenirken, bu azalmanın melatonin verilmesi ile düzeldiği gözlemlendi. Artan oksidatif stres durumlarında radikallerin inhibe edilmesinde GSH'in önemli rolü olduğu bilinmektedir (68,69,70). GSH hem doğrudan hem de GSH-Px enzime substrat olarak serbest radikalleri inhibe etmektedir. Bu çalışmamızda overektomize grupta GSH düzeyinin azalması artmış oksidatif strese bağlı GSH kullanımının artışına bağlandı. Melatoninin serbest radikalleri inhibe etmesi ve antioksidan sistemi desteklemesi ile de melatonin verilen grupta GSH düzeylerinin arttığı gözlemlendi. Nazıroğlu ve arkadaşları diyabetik ve diyabetik olmayan postmenopozal kadınlarda plazma ve alyuvar GSH düzeylerini kontrol grubuna kıyasla düşük olduğunu gözlemlemişlerdir (126) ve bu sonuç bizim araştırma bulgularımızı desteklemektedir.

Beyin korteks GSH-Px değerleri incelendiğinde gruplar arası farklılık bulunmadığı gözlemlendi. Yukarıda belirtildiği reaktif oksijen türlerinin inhibe edilmesinde enzimatik antioksidanlar kadar enzimatik olmayan antioksidanlar da rol oynamaktadır. Bu tezin dışında aynı deney hayvanı beyinlerinde yaptığımız antioksidan vitamin analizi çalışmasında plazma E ve A vitamini düzeylerinin önemli düzeyde azaldığını gözlemledik. Bu nedenle, overektomize grupta artan serbest radikal üretimini inhibe etmede yağda eriyen vitaminlere bağımlı non- enzimatik mekanizmaların

enzimatik inhibisyon mekanizmasından daha etkili olduğu gözlemlendi. Yaptığımız literatür taramalarında GSH-Px, antioksidan vitamin ve lipid peroksidasyon değerlerinin birlikte araştırıldığı çalışmalara rastlanılmadı. Fakat Akkuş ve ark. lipid peroksidasyon düzeyi artarken GSH ve GSH-Px değerlerinin değişmediğini menopoz dışındaki diğer hastalıklarda gözlemlemiştir (128). Ayrıca, hem katalaz hemde GSH-Px enzimleri aynı işi yaparak hidrojen peroksidi suya kadar parçalamaktadırlar. Bu çalışmamızın bir eksikliği katalaz düzeylerinin ölçülmemiş olmasıdır. Hidrojen peroksit katalaz tarafından parçalandığından dolayı GSH-Px enzimine serbest radikallerin inhibisyonunda ihtiyaç kalmamış olabilir.

Glutamatın en önemli 3 reseptöründen bir tanesi NMDA reseptörleridir. N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR) bir ionotropik glutamat reseptörüdür. NMDAR 3 subunit sınıfından – NMDAR1 (NR1), NMDAR2 (NR2) ve NMDAR3 (NR3) – oluşan bir heteromerik proteindir. NR2A'dan NR2D'ye NR2 subunitlerini dört farklı gen kodlar. Tek başlarına eksprese edildiklerinde fonksiyonel kanal oluşturamayan NR2 subunitleri, NR1 subunitleriyle birleştiklerinde NMDAR kanal özelliklerini değiştirebilirler (146). Bu reseptör sinaptogenez ve sinaptik plastisite dahil santral sinir sisteminin çok çeşitli süreçlerinde yer alır. Ayrıca NMDAR'ın eksitotoksisite, nörodejeneratif bozukluklar ve yaşlanmada da yer aldığına işaret edilmiştir (147). Öğrenme ve hafıza'ya dair en yoğun çalışılmış hücrel ve moleküler model olan 'uzun süreli potansiyel artışı (LTP), hipokampusta genellikle NMDAR aktivasyonuna bağlıdır (148). Subunit kompozisyonu NMDA reseptörlerinin farmakolojik ve fizyolojik özelliklerini çok yüksek oranda etkiler (149).

NMDA reseptörlerinin uyarılması sitozole Ca^{+2} akışına neden olmaktadır. Sitozole kalsiyum akışı mitokondrinin depolarizasyonu ve nitrik oksit sentaz enzimi aktivasyonu ile serbest radikallerin üretimini artırmaktadır(129). Artan serbest radikaller voltaja duyarlı Ca^{+2} kapıları, NMDA reseptörleri ve transient reseptör potansiyel melastatin-2 (TRPM2) kanallarını açarak geri bildirim mekanizması ile sitozole daha fazla Ca^{+2} akışı ve daha fazla mitokondri depolarizasyonuna bağlı olarak serbest radikaller meydana gelmektedir(127,129,130). Bu çalışmamızda overektomize grupta NMDA reseptörlerinin azalmış olması sitozole Ca^{+2} akışının artışı göstermektedir. Buna bağlı olarak da MDA düzeylerinde artış meydana gelmiş olabilir. Melatonin verilen grupta NMDA reseptörlerinin düzelmesi melatoninin bu reseptörler üzerindeki

koruyucu etkisine bağlanabilir. Çalışmamızda ikinci bir eksiklik nitrik oksit radikallerinin ölçülemediği olmasıdır. Bunlarda ölçülmüş olsa idi, araştırma bulguları daha iyi yorumlanmış olacaktı.

Bütün bu bilgiler ışığında şu soru sorulabilir: melatonin uzun ömürlü olma ile ilişkili midir?

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda literatürde ilk kez beyin korteks lipid peroksidasyon düzeylerinin arttığını, GSH düzeylerinin azaldığını, NMDA reseptörlerinin azaldığını gözlemledik. Melatonin verilmesi ile oksidatif stres ve NMDA reseptörleri ile ilgili bozuklukların düzeldiğini gözlemledik.

Benzer çalışmaların insanlarda yapılması ile desteklenmesine ihtiyaç vardır. Benzer sonuçlar insan çalışmalarında da gözlemlenirse, menopozda HRT tedavisi yerine melatonin tedavisi uygulanması tavsiye edilebilecektir.

Bununla beraber, melatonin tamamen güvenli bir molekül olarak düşünülmemelidir, bazı durumlarda tehlikeli olabilir, teratojenik riski henüz bilinmediğinden ve hayvan deneylerinde lösemi benzeri bazı kanserler gelişmeye başladığından şu anda gebelikte bazı kısıtlamalar yapılmalıdır (160). Bundan dolayı kontrolsüz herhangi bir melatonin uygulaması reddedilmelidir, klinik ya da laboratuvar araştırmalarıyla bir eksiklik saptanmışsa bazı koşullarda kesin bir replasman düşünülmelidir. Bu sonuçlar ileri araştırmaları ve açıklamaları gerektirir. Fizyolojisinin anlaşılması -başta kadınlardaki yaşlanma olmak üzere- yaşlanma süreci ile ilgili hekimler için yeni tanısal araçlar sunabilir. Melatonin, fizyolojisi daha iyi anlaşılana kadar reçetesiz satılmamalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Spencer JL, Waters EM, Romeo RD. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol* 2008 May; 29(2):219-37.
2. Delibaş N, Tüzmen N, Yönden Z. Effect of functional pinealectomy on hippocampal lipid peroxidation, antioxidant enzymes and N- methyl- D-aspartate receptor subunits 2A and 2B in young and old rats. *Neuroendocrinol Lett* 2002; 23: 345-350.
3. Pieri C, Marra M, moroni F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 1994;55(15):271-277.
4. Nazıroğlu M, Şimşek M, Şimşek H. The effects of hormone replacement therapy combined with vitamins C and E on antioxidants levels and lipid profiles in postmenopausal women with Type 2 diabetes. *Clin Chim Acta.* 2004 Jun; 344(1-2): 63-71.
5. Strauss JF, Barbieri RL. Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology. Ankara: Güneş Kitabevi: 2006,5. Baskı:421-445.
6. Fortner K, Szymanski L, Fox H. Johns Hopkins Jinekoloji ve Obstetri El Kitabı. Ankara: Güneş Kitabevi: 2008,3.Baskı:451-456.
7. Çiçek N, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A. Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ankara: Güneş Kitabevi:2005:1163-1181.
8. Beall CM. Ages at menopause and menarche in a high-altitude Himalayan population. *Ann Hum Biol* 1983;10:365-370.
9. Torgerson DJ, Thomas RE, Campbell MK, Reid DM. Alcohol consumption and age of maternal menopause are associated with menopause onset. *Maturitas* 1997;26:21-25.
10. Dane S, Reis N, Pasinlioğlu T. Left handed women have earlier age of menopause. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1999;10:147-150.
11. Midgette AS, Baron JA. Cigarette smoking and the risk of natural menopause. *Epidemiology* 1990; 1:474-480.
12. Torgerson DJ, Avenill A, Russell IT. Factors associated with onset of menopause in women aged 45-49. *Maturitas* 1994;19(2):83-92.
13. Atasü T, Özekici Ü, Hekim N. Yaşlanma ve Mepozun Meydana Gelişi-Menopoz Tedavisi ve Kanser. İstanbul: Nobel Tıp Kitapları:2001,1Baskı, s: 35-47.
14. Feng Z, Cheng Y,Zhang J. Long-term effects of melatonin or 17 beta-estradiol on improving spatial memory performance in cognitively impaired, ovariectomized adult rats. *J Pineal Res.*2004;37:198-206
15. Ertüngealp E, Oral E. Yaşlanma Biyolojisi ve Endokronolojik Değişiklikler. İstanbul: Form Reklam Hizmetleri, 2000;1. Baskı, s.11-22.
16. McKinlay M.S. The normal menopause transition: an overview. *Maturitas* 1996; 23:137-145.

17. Atasü T, Özekici Ü, Hekim N. Menopoz Tedavisi ve Kanser. İstanbul: Nobel Tıp Kitapları, 2001;1. Baskı, s: 95-109.
18. Hekim N, Atasü T, Özekici Ü. Menopozun oluşumu ve devamındaki endokrinolojik değişiklikler ve getirdiği sorunlar. İstanbul: Nobel Tıp Kitapları, 2001;1. Baskı, s: 47-63.
19. Hormon Replasman Tedavisi “Konsensus Sonuçları”. Türkiye Menopoz ve Osteoporoz Derneği ve Türkiye Jinekoloji Obstetrik Derneği. İstanbul, Kasım 2002; s:23-24.
20. Kobayashi T, Tamura M, Hayashi M. Elevation of tail skin temperature in ovariectomized rats in relation to menopausal hot flushes. *Maturitas* 10;49(4): 2004; 292-303.
21. MacLeay J.M, Lehmer E, Enns R.M. Central and peripheral temperature changes in sleep following ovariectomy. *Maturitas* 20;46(3): 2003;231-238.
22. Kim YH, Lee KA. Symptom experience in women after hysterectomy. *JOGNN* 34: 2005; 233-240.
23. Tüzin F, Tüzin S. Postmenopozal osteoporozda egzersiz. Ed: Ertüngealp E, Seyisoğlu H., Menopoz ve Osteoporoz, 1. Baskı, , Form Reklam Hizmetleri, İstanbul, 2000; s. 452-462.
24. Deeks AA, McCabe MP. Well-being and menopause: an investigation of purpose in life, self-acceptance and social role in premenopausal, perimenopausal and postmenopausal women. *Qual Life Res* 2004; 13(2):389-398.
25. Seyisoglu H. Post-menopozal dönemde Kardiovasküler sistem, Ed: Ertüngealp E, Seyisoglu H, Menopoz ve Osteoporoz. 1. Baskı, Form Reklam Hizmetleri, İstanbul, 2000; s. 96-104.
26. Pinhey TK, Pinhey DL. Life event timing and the emotional consequences of surgical menopause for Asian-Pacific women in Guam. *Women Health* 36(4): 2002;43-54.
27. Busch CM, Zonderman AB, Costa PT. Menopausal transition and psychological distress in a nationally representative sample: Is menopause associated with psychological distress? *J Aging Health* 6(2): 1994; 209-228.
28. Seyisoglu H, Atasü T, Özekici Ü. Menopoz ve seksüel yaşam 1. Baskı, Nobel Tıp Kitap Evi, İstanbul, 2001; s. 385-396.
29. Bruschi F, Meschia M, Soma M. Lipoprotein and other lipids after oophorectomy and estrogen replacement therapy *Obstet Gynecol* 88(6): 1996; 950-954.
30. Gordon JD, Speroff L. Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite El kitabı. Isık AZ, Vicdan K, 1.Baskı Nobel Tıp Kitap Evi, İstanbul, 2003; s:298-321.
31. Bilgin Z, Bilgin O. Menopoz ve deri. Ed: Ertüngealp E, Seyisoğlu H, Menopoz ve Osteoporoz. 1. Baskı Form Reklam Hizmetleri, İstanbul, 2000; s: 90-95.
32. Gail A.L, Connor EB, Donna KS. Hysterectomy, Oophorectomy and Endogenous Sex Hormone Levels in Older Women: The Rancho Bernardo Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85(2): 645-651.

33. Garcia-Perez MA, Moneno-Mercer J, Tarin JJ. Bone turnover markers and PTH levels in surgical versus natural menopause. *Calcif Tissue Int* 2004;74(2): 143-9.
34. Bilgin Z, Bilgin O. Menopoz ve deri 1. Baskı Form Reklam Hizmetleri, 2000; İstanbul, 90-95.
35. Dinç A, Eryavuz M, Özenoglu A. Peri ve Postmenopozal Kadınlarda Diyetin Kemik Mineral Yoğunluğu Üzerine Etkisi 2002; *Osteoporoz Dergisi*, 3(2): 52-56.
36. Atasü T, Benian A. Menopoz ve kemik sistemi ilişkisi 2001; 1. Baskı, Nobel Tıp Kitap Evi, İstanbul, s: 311-357.
37. Taşkın L, Koçak F. Histerektomi ameliyatı sonrası kadınların sağlık bakımlarına ilişkin bilgi gereksinimlerinin belirlenmesi 1997; Hacettepe Üniversitesi HYO Dergisi. 4(1): 13-17.
38. Ertüngealp E, Seyisoğu H. Menopoz ve Osteoporoz. 2000; 1.Baskı, Form Reklam Hizmetleri, İstanbul, s. 347-366.
39. Woods NF, Mitchell ES. Symptoms during the perimenopause: prevalence, severity, trajectory and significance in women's lives. 2005; *Am J Med* 118(12 Suppl2):12-24.
40. Yiğit EA, Arslan M, Yazıcı FG. Doğal ve Cerrahi Menopozda Psikiyatrik Bozukluklar *Journal Of Gynecology And Obstetrics* 2003; 17(1):25-29.
41. Halliwell B. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc* 1987; 46:13-26.
42. Cheeseman, KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Brit Med Bulletin*1993; 149: 481-93.
43. Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences* 1999; 65: 1865-74.
44. Valko M, Rhodes Cj, Moncol J, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stres- induced canser. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
45. G. Loschen, B. Flohe. Chance respiratory chain linked H2O2 production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett* 1971; 18: 261-3.
46. Bondy SC, Naderi S. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 155-9.
47. Akkuş S. Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri. Mimoza Basım, Yayım ve Dağıtım AŞ. Konya. 1995; 13-31, 32-37, 42- 61.
48. Borges F, Fernandes E, Roleira F. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr Med Chem* 2002; 9: 195-217.
49. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman. Oxygene radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 526-45.

50. Freeman Ba, Crapo JD. Biology of disease, Free radicals and tissue injury. *Lab invest* 1982; 47: 412-26.
51. Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species in living systems: source, Biochemistry and Role in Human Disease. *Am J Med* 1991; 91: 14-21.
52. Halliwell B, Gutteridge B. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. *FEBS Lett* 1992; 27: 108-112.
53. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-389.
54. Foote CS, Shook FC, Abakerli RB. Characterization of singlet oxygen. *Methods Enzymol* 1984; 105: 36-47.
55. Archer S. Measurement of nitric-oxide in biological models. *FASEB J* 1993; 7: 349-60.
56. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG, Nitric oxide synthesis: structure, function and inhibition, *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
57. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-Nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329:2002-12.
58. Robbins RA, Grisham MB. Nitric Oxide. *Int J Biochem Cell Biol.*1997; 29: 857-860.
59. Yaman H, Unlu A, Karabıcak U, Cimen B et al. Measurement of 3-Nitrotyrosine by high performance liquid chromatography. *T Clin Med Res* 2000; 18: 26-30.
60. Kayalı R, Çakatay U. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpasa J Med* 2004; 35 : 83-89.
61. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. *J Biol Chem* 1991; 266: 4244-4250.
62. Murphy MP, Packer MA, Scarlett JL, Martin SW. Peroxynitrite: A biologically significant oxidant. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 179-86.
63. Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, Genc K, Genc S, Sonmez U et all. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 160: 146-156.
64. Cochran CG. Cellular injury by oxidants. *Am. J. Med* 1991; 92: 235-305.
65. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as biomarkers of Tissue Damage. *Clin Chem* 1995; 41:1819-1828.
66. Baydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS et al. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol Lett* 2003; 137:169-174.
67. Wu D, Cederbaum A.I. Alcohol, oksidative stres and free radical damage. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 277-284.

68. Halliwell B. Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Med Biol* 1984; 62: 71-77.
69. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am J Med* 1994; 26: 5-12.
70. Khan JY, Black SM. Developmental changes in murine brain antioxidant enzymes. *Pediat Res* 2003; 54: 77-82.
71. Chapple ILC: Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol*.1997; 24: 287-296.
72. Halliwell, B., Gutteridge, JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.
73. Mills GC. Hemoglobin catabolism. glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 1957; 229: 189-197.
74. Malone WF. Studies evaluating antioxidants and beta carotene as chemopreventives. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 305-313.
75. Carr A C. Carr BZ, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (Vitamin C) and α -Tocopherol (Vitamin E). *Circ Res* 2000; 87: 349-354.
76. K Maiese, F Li and Z Z Chong. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 577-83.
77. Jelkman W. Erythropoietin: Structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992; 72: 449-489.
78. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, in the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587-2592.
79. Lee Kavanau J. Biological time-keeping mechanisms: A need for broader perspectives. *Med Hypotheses*. 2006 Jul 21; [Epub ahead of print]
80. Macchi MM, Bruce JN. Human physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinol* 2004; 25: 177-195.
81. Guyton AC, Hall JE. *Text Book of Medical Physiology (Tıbbi Fizyoloji)*. Çavuşoğlu H (Çev. Ed.), 9. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, İstanbul 1996, ss 1015-1016.
82. Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1980;1: 109-131.
83. Hardeland R, Pandi-Perumal SK, Cardinali DP. Molecules in focus: Melatonin. *Intern J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 313-316.
84. Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991;79:C153-C158.
85. Von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 2002; 309(1): 151-162.

86. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Kolakowski LF. Cloning of melatonin related receptor from human pituitary. *FEBS Lett* 1996; 386: 219-224.
87. Turek FW, Gillette MU. Melatonin, sleep and circadian rhythms: rationale for development specific melatonin agonists. *Sleep Medicine* 2004; 5: 523-532.
88. Reiter RJ. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochem Int* 1995; 27(6): 453-460.
89. Benites G, Anton JF. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effect. *Experientia* 1993; 49: 635-641.
90. Brezezinski A. Melatonin in humans. *N English J Med* 1997; 336: 186-195.
91. Poeggeler B. Melatonin, aging, and age-related diseases: perspectives for prevention, intervention, and therapy. *Endocrine* 2005; 27(2): 201-212.
92. Uwe D. Melatonin deficiencies in women. *Maturitas* 41 Suppl. 1 2002; 85-104.
93. Dawson D, Encel N. Melatonin and sleep in humans. *J Pineal Res* 1993; 15: 1-12.
94. Dijk DJ, Von Schantz M. Timing and consolidation of human sleep, wakefulness, and performance by a symphony of oscillators. *J Biol Rhythms* 2005; 20(4): 279-290.
95. Silman RE. Melatonin: a contraceptive for the nineties. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993;49:3-9.
96. Cos S, Gonzalez A, Martinez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C, Sanchez-Barcelo EJ. Estrogen-signaling pathway: A link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detect Prev* 2006; 30(2): 118-128.
97. Balik A, Kretschmannova K, Mazna P, Svobodova I, Zemkova H. Melatonin action in neonatal gonadotrophs. *Physiol Res* 2004; 53 Suppl 1: S153-166.
98. Okamura H. Circadian and seasonal rhythms: Integration of mammalian circadian clock signals from molecule to behavior. *J Endocrinol* 2003; 177;3-6.
99. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005; 27(2): 189-200.
100. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 17(2): 273-285.
101. Muller-Wieland D, Behnke B, Koopmann K, Krone W. Melatonin inhibits LDL receptor activity and cholesterol synthesis in freshly isolated human mononuclear leucocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203 (1): 416-421.
102. Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vivo. *Free Radical Biol Med* 1996; 21: 307-315.

103. Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR. Melatonin-a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738:419-420.
104. Reiter RJ, Carneiro RG, Oh S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997; 29: 363-372.
105. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1: 57-60.
106. Jacob S, Poeggeler B, Weishaupt JH. Melatonin as a candidate compound for neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): High tolerability of daily oral melatonin administration in ALS patients. *J Pineal Res* 2002; 33: 186-187.
107. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994; 55: 271-276.
108. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci* 1994; 55: 455-460.
109. Blanchard B, Pompon D, Ducrocq C. Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. *J Pineal Res* 2000; 29: 184-192.
110. Yıldırım M. Tıp Öğrencileri İçin Klinik Nöroanatomî, 4. basımdan çeviri. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, 2000.
111. Dere F. Nöroanatomî ve Fonksiyonel Nöroloji, Okullar Pazarı Kitabevi, 1990.
112. Ozawa S, Haruyuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. 1987; *Progress in Neurobiology* 54: 581-618.
113. Heresco U. Glutamatergic neurotransmission modulation mechanisms of antipsychotic atypicality. 2003; *Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 23: 1113-1123.
114. Goebel DJ., Poosch MS. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. 1999; *Molecular Brain Research* 69:164-170.
115. Cull-Candy S., Brickley SG. NMDA receptors. 2001; *Encyclopedia of Life Sciences*
116. Carroll RC, Zukin RS. NMDA-receptor trafficking and targeting: Implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in Neuroscience*. 25:571-577, 2002.
117. Petrie RJA, Reid IC, Stewart CA. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity and depressive disorder. 2000; *Pharmacology and therapeutics*. 87:11-25.
118. Yakamura T, Shimoji K. Subunit and site specific pharmacology of the NMDA receptor channel. 1999; *Progress in Neurobiology*. 59:279-298.
119. Candelario-Jalila E, González-Falco'na E. Wide therapeutic time window for nimesulide neuroprotection in a model of transient focal cerebral ischemia in the rat. 2004; *Brain Research*. 1007:98-108.

120. Wittenberg GM., Tsien JZ. An emerging molecular and cellular framework for memory processing by the hippocampus. 2002; Trends in Neurosciences. 25:571-77.
121. Khanduja KL, Sohi KK. Nimesulide inhibits lipopolysaccharide-induced production of superoxide anions and nitric oxide and iNOS expression in alveolar macrophages. Life Sciences. 2006; 78: 1662-1669.
122. Smith JW, Al-Khamees O. Chronic aspirin ingestion improves spatial learning in adult and aged rats. 2002; Pharmacology biochemistry and behavior. 71:233-238.
123. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. 1970; Nature 227:680-689,
124. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folinphenol reagents. 1951; J Biol Chem. 193:265-275.
125. Nazıroğlu M. Molecular Mechanisms of Vitamin E on Intracellular Signalling Pathways in Brain. In: Reactive Oxygen Species and Diseases (ISBN: 978-81-308-0181-0) Ed.; Laszlo Goth, Research Signpost Press: Kerala, India. pp 2007, 239-256.
126. Nazıroğlu M, Şimşek M, Şimşek H. Effects of hormone replacement therapy, vitamin C and E supplementation on antioxidants levels, lipid profiles and glucose homeostasis in postmenopausal women with Type 2 diabetes. Clin. Chim Acta. 2004; 344: 63-71.
127. Nazıroğlu, M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. 2007; Neurochemical Research, 32: 1990-2001.
128. Akkuş S, Nazıroğlu M, EriŐ S. Levels of lipid peroxidation, nitric oxide and antioxidant vitamins in plasma of patients with fibromyalgia. Cell Biochem Funct 2009, 27;181-185.
129. Nazıroğlu M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress- induced molecular pathways in epilepsy. Neurochem Res Published online:10 June 2009
130. Kovács R, Schuchmann S, Gabriel S. Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slice cultures. J. Neurophysiol, 2002; 88, 2909-2918.
131. Dubey RK, Jackson EK. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical and molecular mechanisms. AmJ Physiol 2001;280:F365-388.
132. Shwaery GT, Vita JA, Keaney FR Jr. Antioxidant protection of for estradiol modification. Circulation 1997;95:1378-1385.
133. Dubey RK, Tyurina YY, Tyurin VA, et al. Estrogen and tamoxifen metabolites protect smooth muscle cell membrane phospholipids against peroxidation and inhibit cell growth. Circ Res 1999;84:229-239.
134. Sudoh N, Toba K, Akishita M, et al. Estrogen prevents oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats. Circulation 2001;103:724-729.
135. Dantas APV, Tostes RCA, Fortes Z. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. Hypertension 2002;39:405-411.

136. Ruiz-Larrea MB, Martin C, Martinez R. Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens. *Chem Phys Lipids* 2000;105:179-188.
137. Lam KK, Yen-Mei Lee, MS, George Hsiao, PhD; Estrogen therapy replenishes vascular tetrahydrobiopterin and reduces oxidative stress in ovariectomized rats; 2006: The North American Menopause Society; Vol.13, No.2, pp.294-302.
138. Lam KK, Hu CT, Ou TY. Effects of oestrogen replacement on steady and pulsatile haemodynamics in ovariectomized rats. *Br J Pharmacol* 2002;136:811-818.
139. Guevara-Guzman R, Arriaga V, Kendrick KM, et al. Estradiol Prevents Ozone-Induced Increases In Brain Lipid Peroxidation and Impaired Social Recognition Memory In Female Rats. *Neuroscience* 2009; 159,940–950.
140. Ceylan-Işık F, Erdoğan-Tulmaç B, Aktan F. Östrojen Yerine Koyma Tedavisinin Overektomili ve Overektomili-Diyabetik Sıçanlarda Doku Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi *Dicle Tıp Dergisi*, 2007; Cilt: 34, Sayı: 4, 275-282.
141. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC. Chemical and physical properties of and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Topics med Chem* 2002; 2: 181-197.
142. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998;56:359-384.
143. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W: Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34:237-256.
144. Antolin I, Rodriguez C, Sainz R. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 1996; 10: 882-890.
145. Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Ann NY Acad Sci* 1998; 854: 410-424.
146. Monyer H, Sprengel R, Schoefer R. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 1992; 256: 1217-1221.
147. Eckles SK, Clayton D, Bickford P. Caloric restriction prevents age related deficits in LTP and in NMDA receptor expression. 2000; *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 78:154-162.
148. Klann E. Cell permeable scavengers of superoxide prevent long-term potentiation in hippocampal area CA1. *J Neurophysiol* 1998; 80: 452-457.
149. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 1994; 12: 529-540.
150. Pelmar TC, Hollinden CE, Sarvey JM. Free radicals accelerate the decay of long-term potentiation in field CA1 of guinea-pig hippocampus. *Neuroscience* 1991; 44(2): 353-359.
151. Shen YX, Xu SY, Wei W. Melatonin reduces memory changes and neural oxidative damage in mice treated with D-galactos. *J Pineal Res* 2002; 32: 173-178.

152. Cugini P, Touitou Y, Bogdan A, et al. Is melatonin circadian rhythms a physiological feature associated with health longevity? A study of long-living subjects and their progeny. *Chronobiol Int* 2001;18:99–107.
153. Reiter RJ, Tang L, Garcia JJ. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997; 60: 2255-2271.
154. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX. Free radical-mediated molecular damage: mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 2001; 939:200-215.
155. El-sherif Y, Tesorieiro J, Hogan MV. Melatonin regulates neuronal plasticity in the hippocampus. *J Neurosci Res* 2003; 72:454-460.
156. Argyriou A, Prast H, Philippu A. Melatonin facilitates short-term memory. *Eur J Pharmacol* 1998; 349:159-162.
157. Brown EN, Choe Y, Shanahan TL, et al. A mathematical model of diurnal variation in human plasma melatonin levels with age. *Am J Physiol* 1997;272:E506–516.
158. Brown GM, Young SN, Gauthier S, et al. Melatonin in human cerebrospinal fluid in daytime, its origin and variation with age. *Life Sci* 1979;272:506–515.
159. Touitou Y, Fevre M, Lagoguey M, et al. Age and mental health related circadian rhythm of plasma levels of melatonin, prolactin, luteinizing hormone, and follicle stimulating hormone in man. *J Endocrinol* 1981;91:467–475.
160. Bartsch C, Bartsch H, Blask DE, Cardinali DP, Hrushesky WJM, Mecke D, editors. *The pineal gland and cancer*. Berlin: Springer, 2001.
161. Liu RY, Zhou JN, van Heerikhuizen J, et al. Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer disease, and apolipoprotein E-epsilon4 genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:323-327.
162. Lavie P. Sleep–wake as a biological rhythm. *Annu Rev Psychol* 2001;52:277–303.
163. Pacchierotti C, Iapichino S, Bossini L, et al. Melatonin in psychiatric disorders: a review on the melatonin involvement in psychiatry. *Front Neuroendocrinol* 2001;22:18–32.
164. Folkard S, Arendt J, Clark M, et al. Can melatonin improve shift worker's tolerance of the night shifts? Some preliminary findings. *Chronobiol Int* 1993;10:315–320.
165. Papezova H, Yamamoto A, Nedvidkova J. Pain modulation role of melatonin in eating disorders. *Eur Psychiat* 2001;16:68–70.
166. Almay BG, von Knorring L, Wetterberg L. Melatonin in serum and urine in patients with idiopathic pain syndromes. *Psychiatry Res* 1987;22(3):179–91.
167. Citera G, Arias MA, Maldonado-Cocco JA, et al. The effect of melatonin in patients with fibromyalgia: a pilot study. *Clin Rheumatol* 2000;19:9–13.
168. Klerman EB, Goldenberg DL, Brown EN, et al. Circadian rhythms of women with fibromyalgia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1034–1039.

169. Chazot G, Claustrat B, Brun J, et al. A chronobiological study of melatonin, cortisol, growth hormone and prolactin secretion in cluster headache. *Cephalgia* 1984;4:213–220.
170. Brugger P, Marktl W, Herold M. Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease. *Lancet* 1995;345:1408.
171. Petranka J, Baldwin W, Biermann J, et al. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cellline. *J Pineal Res* 1999;26:129–136.
172. Fraschini P, Demartini G, Esposti D, et al. Melatonin involvement in immunity and cancer. *Biol Signals Recept* 1998;7:61–72.
173. Erren TC, Piekarski C. Winter darkness in the arctic cancer in the light of the melatonin hypothesis. Symposium: low frequency EMF, visible light, melatonin and cancer. Abstract Book Cologne 2000.
174. Conti A, Maestroni GJM. Melatonin induced-immunomodulators: role in lymphoproliferative and autoimmune disease. In: Maestroni GJM, Conti A, Reiter RJ, editors. *Advance in pineal research 7*. London: John Libby and Company, 1994.
175. Cagnati A, Arangino S, Renzi A, et al. Influence of melatonin administration on glucose tolerance and insulin sensitivity of postmenopausal women. *Clin Endocrinol* 2001;54:339–346.

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

MÜFİDE DİLEK'e ait 'DENEYSEL RAT MENOPOZ MODELİNDE MELATONİN'İN ROS VE NMDA RESEPTÖRLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI' adlı çalışma jürimiz tarafından Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih :

İmza

Prof. Dr. M.Tamer Mungan(Kadın Hastalıkları ve Doğum A.B.D Başkanı)

Prof. Dr.H.Baha Oral(Kadın Hastalıkları ve Doğum A.B.D Öğretim Üyesi)

Prof. Dr.Gökhan Bayhan (Kadın Hastalıkları ve Doğum A.B.D Öğretim Üyesi)

Doç. Dr.Mehmet Güney (Kadın Hastalıkları ve Doğum A.B.D Öğretim Üyesi)

Doç. Dr.Pakize Kırdemir(Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.B.D Öğretim Üyesi)