

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OVERİEKTOMİZE RATLARDA SELEKTİF ÖSTROJEN  
RESEPTÖR MODÜLATÖRÜ UYGULAMASININ  
NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Biyokimya (Eczacılık) Programı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Eczacı  
Güliz DURMAZ**

**Danışman  
Prof. Dr. Ayfer YALÇIN**

**İZMİR  
2006**



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OVERİEKTOMİZE RATLARDA SELEKTİF ÖSTROJEN  
RESEPTÖR MODÜLATÖRÜ UYGULAMASININ  
NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Biyokimya (Eczacılık) Programı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Eczacı  
Güliz DURMAZ**

**Danışman  
Prof. Dr. Ayfer YALÇIN**

**İZMİR  
2006**



## İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vii

### BÖLÜM I

#### GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Genel Bilgiler .....	3
1.1.1 Selektif Östrojen Reseptör Modölatörleri (SERMs) .....	3
1.1.1.1 Östrojen ve SERM'lerin Etki Mekanizması.....	5
1.1.1.2 SERM ve Nöroprotektif Mekanizma .....	6
1.1.2 Eksitotoksisite ve Nörodejenerasyon .....	11
1.1.2.1 Kainik Asitin Nörodejenerasyondaki Yeri .....	11
1.1.3 Glutasyon (GSH) .....	14
1.1.3.1 Glutasyonun Fonksiyonları .....	15
1.1.3.2 Glutasyon Sentezi.....	16
1.1.3.3 Glutasyon Metabolizması.....	16
1.1.3.4 Glutasyon ve Beyin Dokusu.....	17
1.1.3.5 Glutasyon Düzeylerinin Değişimi ve Nörodejenerasyon İle İlişkisi .....	18
1.1.4 Nitrik Oksit .....	20
1.1.4.1 Nitrik Oksit ve Nörodejenerasyon.....	21
1.1.4.2 Nitrik Oksit ve Nöroprotektif Mekanizma .....	22
1.1.5 Bcl-2 Ekspresyonu ve Nöroprotektif Mekanizma .....	26

## BÖLÜM II

### 2 GEREÇ VE YÖNTEM

2.1	Kullanılan Aletler .....	29
2.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	30
2.3	Kullanılan Çözeltiler .....	32
2.4	Çalışma Grupları .....	35
2.4.1	Deney Hayvanlarının Seçimi ve Gruplandırılması .....	35
2.5	Kullanılan Yöntemler .....	37
2.5.1	Örneklerin GSH Miktar Tayini İçin Homojenizasyonu .....	37
2.5.2	GSH Miktar Tayini Yöntemi .....	37
2.5.3	GSH Miktar Tayini Belirlenmesinde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması .....	38
2.5.4	Protein Miktar Tayini Belirlenmesinde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması .....	38
2.5.5	Protein Miktar Tayini Yöntemi .....	39
2.5.6	Örneklerin Nitrit-Nitrat Miktar Tayini için Homojenizasyonu .....	40
2.5.7	Nitrit Miktar Tayin Yöntemi.....	40
2.5.8	Nitrat Miktar Tayini Yöntemi.....	41
2.5.9	Beyin Korteks Dokusundan Total RNA İzolasyonu .....	42
2.5.10	Total RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	43
2.5.11	Total RNA'dan Revers Transkripsiyon Yöntemiyle cDNA Sentezi.....	44
2.5.12	PCR İle cDNA Amplifikasyonu ve Bcl-2 Ekspresyon Düzeylerinin Saptanması .....	46
2.5.13	Agaroz Jel Elektrofrezisi .....	48

2.5.14 Jelin Boyanması ve Görüntülenmesi .....	49
2.5.15 Bcl-2 Ekspresyon Düzeylerinin Dansitometrik Analizi .....	50
2.6 İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi .....	50
2.7 Etik Kurul Onayı.....	51

### **BÖLÜM III**

#### **3 BULGULAR**

3.1 GSH Miktar Tayini İçin Standart Eğri Çizimi .....	52
3.2 Protein Miktar Tayini İçin Standart Eğri Çizimi.....	53
3.3 Beyin Korteks Doku Örneklerinde GSH Düzeyleri .....	54
3.4 Beyin Korteks Doku Örneklerinde Nitrit-Nitrat Düzeyleri .....	56
3.5 Beyin Korteks Doku Örneklerinden İzole Edilen Total RNA'ların konsantrasyonları ve A260/A280 oranları.....	57
3.6 Beyin Korteks Doku Örneklerinde Bcl-2 Ekspresyonlarına Yönelik Görüntüler.....	58
3.7 Beyin Korteks Doku Örneklerinde Bcl-2 Ekspresyonlarının Dansitometrik Analizine Yönelik Bulgular .....	61
3.8 Bcl-2 Ekspresyonunun GSH ve Nitrit/Nitrat Düzeyleriyle İlişkisi .....	63

### **BÖLÜM IV**

#### **4 TARTIŞMA VE SONUÇLAR**

4.1 Örnek Seçimiyle İlgili Tartışma .....	64
4.2 Bcl-2 Ekspresyonunun Saptanmasında Seçilen Yöntem İle İlgili Tartışma .....	64

4.3 Beyin Korteks Doku Örneklerinde GSH Düzeyleri İle İlgili Tartışma .....	67
4.4 Beyin Korteks Doku Örneklerinde Nitrit-Nitrat Düzeyleri İle İlgili Tartışma .....	69
4.5 Beyin Korteks Doku Örneklerinde Bcl-2 Ekspresyonunun Dansitometrik Analizine Yönelik Tartışma .....	69
<b>ÖZET .....</b>	<b>74</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>76</b>
<b>YARARLANILAN KAYNAKLAR.....</b>	<b>78</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>94</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Raloksifenin kimyasal yapısı .....	4
Şekil 2.	Östrojenin etki mekanizması .....	6
Şekil 3.	Östrojen ve SERM'lerin olası nöroprotektif etki mekanizması.....	9
Şekil 4.	Kainik asitin nörodejeneratif etki mekanizması .....	13
Şekil 5.	Glutasyon metabolizması .....	17
Şekil 6.	GSH düzeylerinin değişimi ve nörodejeneratif hastalıkların altyapısını oluşturan olası mekanizmalar .....	19
Şekil 7.	Nitrik oksitin vasküler etkisi .....	23
Şekil 8.	Bcl-2 ve Bax dimerleşmesi, apoptozom oluşumu .....	28
Şekil 9.	GSH absorbans-konsantrasyon eğrisi .....	53
Şekil 10.	Protein absorbans-konsantrasyon eğrisi.....	54
Şekil 11.	Kontrol, Raloksifen ve Ral+KA gruplarına ait beyin korteks dokusundaki GSH düzeylerinin (ortalama $\pm$ S.H) dağılımı .....	55
Şekil 12.	Kontrol, Raloksifen ve Ral+KA gruplarına ait beyin korteks dokusundaki total nitrit+nitrat düzeylerinin (ortalama $\pm$ S.H) dağılımı .....	57
Şekil 13.	Kontrol grubuna ait beyin korteks doku örneklerinde Bcl-2 ekspresyonunun agaroz jel üzerinde kalitatif olarak gösterilmesi.....	59
Şekil 14.	Raloksifen grubuna ait beyin korteks doku örneklerinde Bcl-2 ekspresyonunun agaroz jel üzerinde kalitatif olarak gösterilmesi.....	60

- Şekil 15. Ral+KA grubuna ait beyin korteks doku örneklerinde Bcl-2 ekspresyonunun agaroz jel üzerinde kalitatif olarak gösterilmesi.....61
- Şekil 16. Kontrol, Raloksifen ve Ral+KA gruplarına ait beyin korteks dokusu örneklerinde Bcl-2/GAPDH ekspresyon oranları (ortalama  $\pm$  S.H) ve gruplar arası dağılımı .....63

**TABLolar DİZİNİ**

Tablo I	Nitrat tayini aşamaları .....	41
Tablo II	cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve miktarları .....	45
Tablo III	cDNA amplifikasyonu için gerekli bileşenler ve miktarları .....	47
Tablo IV	GSH standart grafiğini oluşturan absorbans değerleri.....	52
Tablo V	BSA standart grafiğini oluşturan absorbans değerleri .....	53
Tablo VI	Kontrol, Raloksifen ve Ral + KA gruplarına ait beyin kortekslerindeki GSH düzeyleri ve ortalama $\pm$ S.H.'ları .....	55
Tablo VII	Kontrol, Raloksifen ve Ral + KA gruplarına ait beyin kortekslerindeki total nitrit-nitrat düzeyleri ve ortalama $\pm$ S.H.'ları .....	56
Tablo VIII	Kontrol, Raloksifen, Ral + KA gruplarına ait beyin kortekslerindeki total RNA konsantrasyonları ve total RNA A260/A280 oranları.....	58
Tablo IX	Kontrol, Raloksifen ve Ral + KA gruplarına ait beyin kortekslerindeki Bcl-2 /GAPDH oranları ve ortalama $\pm$ S.H.'ları .....	62

## BÖLÜM I

### GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda östrojenin beyinde iskemi, Alzheimer benzeri yaşlanmaya bağlı bazı nörodejeneratif hastalıklar ve hücre ölümüne yol açan diğer nöropatolojik olaylarda koruyucu olduğuna yönelik bulgular ortaya konmuştur. Östrojenin beyindeki nöroprotektif etkisinin üç şekilde meydana gelebileceği öne sürülmektedir. Buna göre, östrojenlerin nöroprotektif etki mekanizmasını doğrudan steroid hormon reseptörlerinin aktivasyonu, bazı nörotransmitterlerin modülasyonu veya antioksidan mekanizmaların aktivasyonu oluşturabilmektedir (11, 35).

Postmenapozal süreçte östrojen hormon replasmanı uygulaması gerçekte hem olumlu hem de olumsuz boyutları içeren bir durum sergilemektedir. Hormon replasman uygulamasını olumlu kılan durumlardan biri östrojenin nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu bir bileşik olduğuna yönelik bazı bulguların ortaya konmuş olmasıdır. Hormon replasmanı konusundaki güncel uygulamalardan biri de doğrudan östrojen yerine selektif östrojen reseptör modülatörlerinin kullanılmasıdır.

Selektif östrojen reseptör modülatörleri (SERMs) farklı östrojenik ve antiöstrojenik-doku spesifik etkilere sahip östrojen reseptörlerini aktive etmek suretiyle etkili olabilen bileşiklerdir. Postmenapozal süreçte SERMs kullanımını klinik açıdan destekleyen bazı araştırmalar öne çıkmaktadır (12).

Ancak bu amaçla kullanılan bileşiklerin olası nöroprotektif etkisinin boyutları konusunda çok sınırlı bulgu vardır (34, 114). Bu çalışmada, overiektomize ratlar kullanılarak oluşturulan menapoz deney modelinde selektif bir östrojen reseptör modülatörü olan raloksifenin beyin korteks dokusundaki koruyucu etkisinin oksidatif stresle ilişkili bazı parametreler ve bazı apoptozis göstergeleri kapsamında araştırılması amaçlanmıştır. Selektif östrojen reseptör modülatörü uygulamasının oksidatif stres etkisine karşı nöroprotektif etkisinin boyutunun çeşitli biyokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemlerle ortaya konmasının bu konudaki bilimsel birikime katkı açısından yararlı olacağı düşünülmüştür.

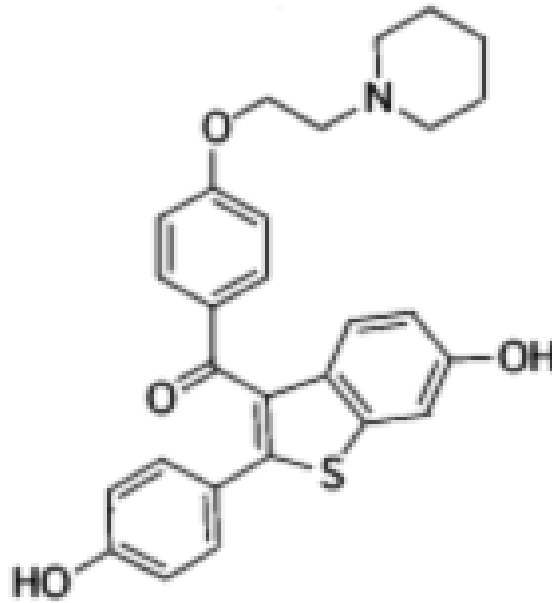
## 1.1. Genel Bilgiler

### 1.1.1. Selektif Östrojen Reseptör Modölatörleri (SERMs)

Östrojen eksikliği ateroskleroz, osteoporoz ve santral sinir sistemi dejenerasyonu gibi birçok patolojik olaya öncülük etmektedir. Östrojen Replasman Tedavisi (ERT) kadınlarda menapoz sonrasında kognitif fonksiyonları sürdürmek, aterosklerozun oluşumunu engellemek, vertebral kırıkları önlemek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (29). Öte yandan östrojenin özellikle meme bezleri ve uterusu tümör oluşumunu ve gelişimini arttırdığı bilinmektedir (40, 70). Östrojenin bu istenmeyen etkilerini önlemek amacıyla çeşitli terapötik alternatifler aranmaya başlanmış ve 1960'lı yıllarda östrojenin yararlı etkilerini beyin, kemik ve arterlerde gösteren ve aynı zamanda östrojen gibi meme ve endometriumda tümör oluşumuna neden olmayan yeni bir ilaç grubu üretilmiştir. Bu bileşiklere dokuya özgü etkilerinden dolayı selektif östrojen reseptör modölatörleri (SERMs) adı verilmiştir (29). 1970'li yıllarda birinci nesil SERM'lerden biri olan tamoksifen metastatik meme kanserinin tedavisinde östrojen antagonisti olarak kullanılmaya başlanmıştır. Tamoksifenin antagonist olarak kullanımının, östrojenin kemiklerdeki mineral yoğunluğunu arttırıcı etkisini de inhibe edeceği düşünülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda tamoksifenin, östrojenin etkisini taklit ederek omurilikte kemik mineral yoğunluğunu arttırdığı, fakat bunun yanında östrojen gibi endometrium kanserine neden

olduğu gözlenmiştir. Buna bağlı olarak tamoksifenin dokuya özđü östrojen agonisti/ antagonisti olarak görev yaptığı saptanmıştır (70).

Tamoksifenden sonra yine SERM sınıfına dahil olan, yapısında benzotiyofen halkası bulunan kimyasal adı [6-hidroksi-2-(4-hidroksifenil)benzo(b)tien-3-il][4-[2-(1-piperidinil)etoksi]fenil]metanon olan yeni bir ilaç, raloksifen (Şekil 1), kemik üzerindeki östrojen agonisti etkisinden dolayı 1997 yılında Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayıyla osteoporoz tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (5, 13, 18, 29, 38, 108, 111). Raloksifen endometriumda kanser oluşumunu tetiklemeyen bir bileşik olarak meme kanserinin önlenmesi amacıyla güvenle kullanılan bir ilaçtır. Raloksifenin ayrıca sıçanlarda serum total kolesterol düzeyini, postmenapozal kadınlarda da serum LDL düzeyini düşürdüğü gösterilmiş, plazma homosistein konsantrasyonunu azalttığı ancak HDL üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı saptanmıştır (29).



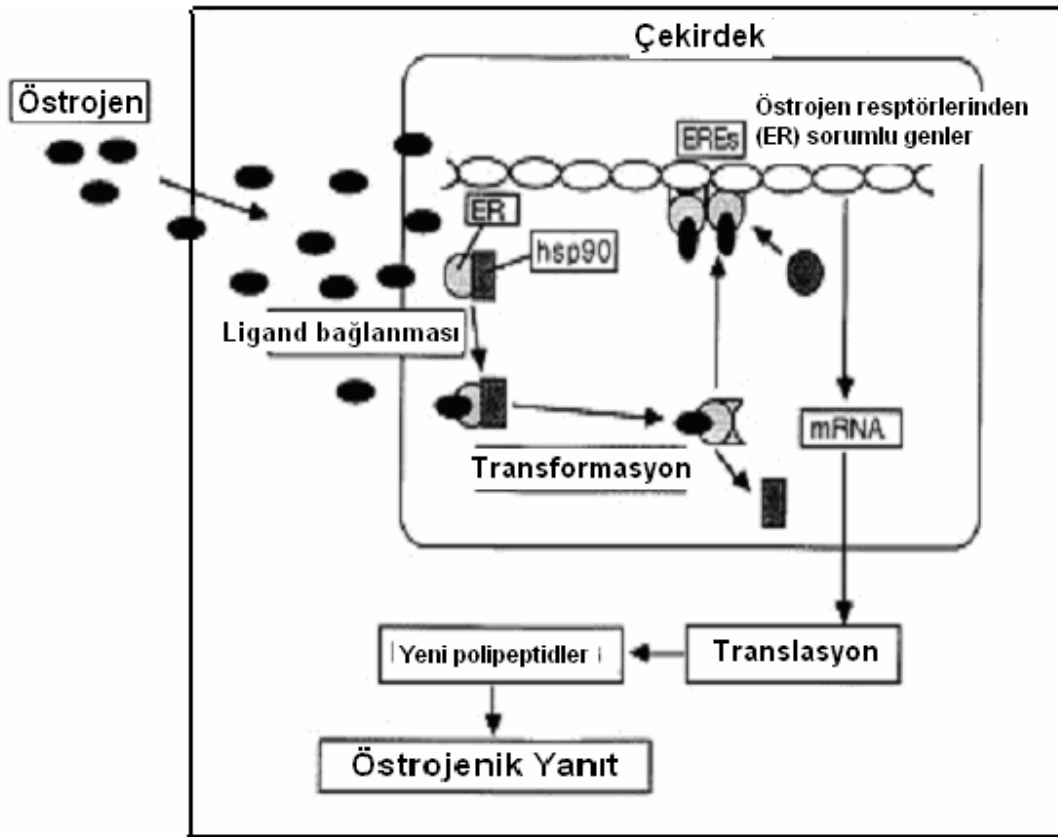
Şekil 1. Raloksifenin kimyasal yapısı

Tamoksifen ve raloksifenden başka droloksifen, GW5638, Idoksifen, LP336156, LY353381 de SERM olarak kullanılmaktadır (70).

#### **1.1.1.1. Östrojen ve SERM'lerin Etki Mekanizması**

Östrojen, dokulardaki etkisini östrojen reseptörleriyle birleşerek göstermektedir. Östrojen reseptörleri çekirdeğe hızla transfer olur ve inaktif halde dururlar. Çeşitli ısı şok proteinleri (Hsp 90, Hsp 56 gibi) östrojen reseptörleriyle kompleks oluşturur ve östrojenin reseptöre bağlanmasını sağlayarak reseptörde konformasyonel bir değişikliğe neden olurlar. Aktivasyondan sonra östrojen reseptör monomerleri arasında protein-protein etkileşimine bağlı olarak dimerleşme görülür. DNA'ya bağlanma afinitesinin yüksek olabilmesi için reseptörler arasında bu dimerleşmeye ihtiyaç vardır. Reseptör daha sonra duyarlı genlerin promotor bölgesindeki östrojen reseptörlerinden sorumlu elementlerle (ERE) etkileşerek hedef gen ekspresyonunun başlamasına yani hormonal etkinin başlamasına neden olmaktadır (39)(Şekil 2).





Şekil 2. Östrojenin etki mekanizması

SERM'ler kardiyovasküler sistem, kemik ve beyin gibi dokularda östrojen agonisti etkiyi östrojene benzer bir mekanizmayla sağlarken uterus ve meme bezlerindeki antagonist etkiyi, östrojen reseptörlerindeki bağlanma bölgelerini bloke ederek göstermektedir (5, 39).

#### 1.1.1.2. SERM ve Nöroprotektif Mekanizma

Gonadal hormonlar omurgalılarda santral sinir sistemi üzerinde üreme ve nöroendokrin olaylarını kontrol etmektedir. Yapılan çalışmaların ardından beyin üzerindeki önemli etkilerinden dolayı bu hormonlara "seks steroidleri" ve "nöroaktif steroidler" denmektedir (97). Gonadal hormonlar, trofik

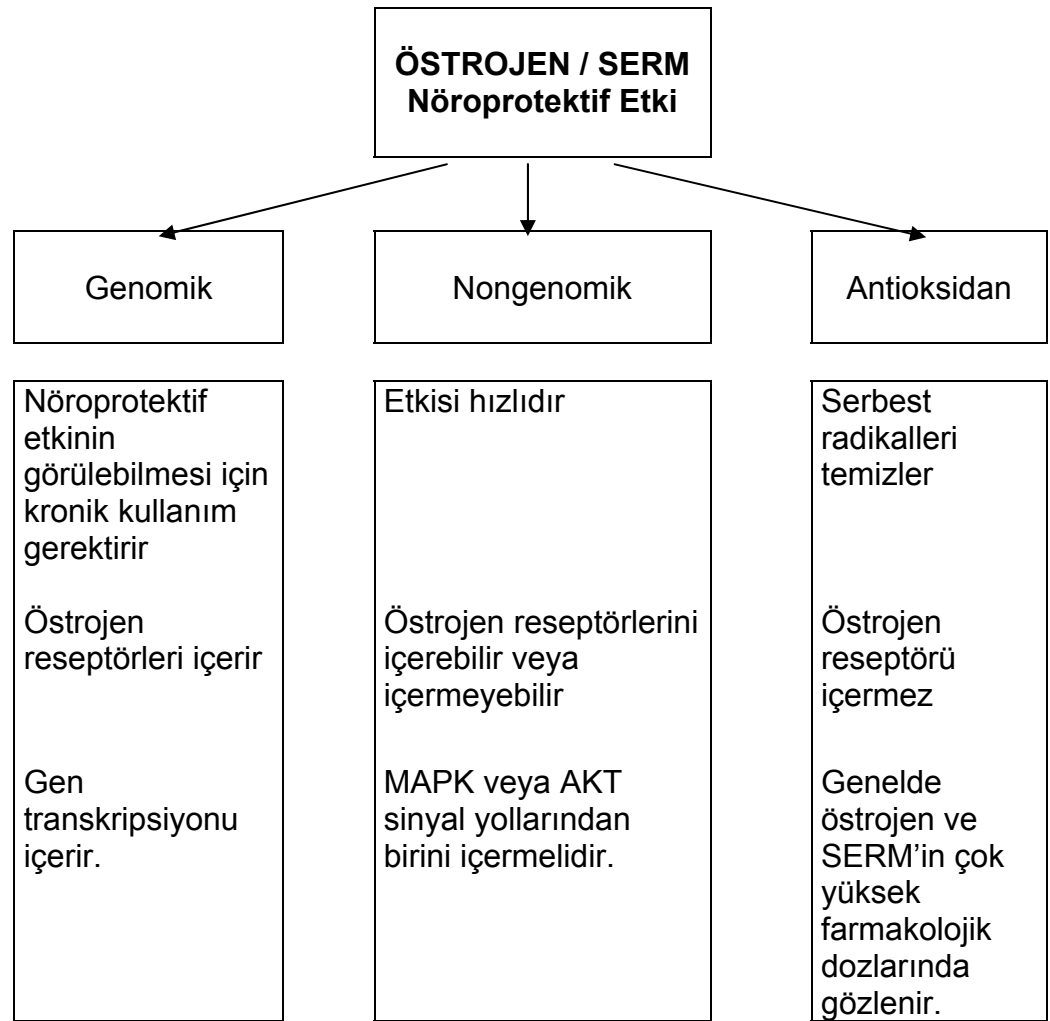
faktörlerden biri olan nörotrofinler gibi görev yapmakta, nöronal düzenlemeyi sağlamakta ve nöroprotektif etkiler göstermektedir (28, 97). Östrojenin nöroprotektif etkisi, nörodejeneratif hastalıklarda ve nöronal travmalarda kullanılacak ilaçların geliştirilmesinde ümit vaat etmektedir. Östrojenin nöroprotektif etkinliği özellikle Alzheimer hastalarıyla yapılan çalışmalarda araştırılmış ve östrojenin postmenapozal süreçteki kadınlarda Alzheimer hastalığına yakalanma riskini azalttığı gösterilmiştir (42, 76, 98, 109). Postmenapozal ve Alzheimer hastası kadınlarda yapılan çalışmalara göre östrojen Alzheimer hastalığı semptomlarını tamamen düzeltmemekle birlikte kognitif kaybı azaltmakta ve postmenapozal kadınlarda bu hastalığın gelişmesini engellemektedir (42, 111). Eberling ve arkadaşlarının (42) yaptığı çalışmada östrojen kullanan kadınların serebral kan akımının arttığı bulunmuştur. Hafıza fonksiyonlarıyla östrojen arasındaki ilk bağlantı menapozu giren kadınlarda hafıza ve konsantrasyon güçlüğü ile ilgili şikayetlerin başlamasıyla kurulmuştur. Yapılan bir çalışmada asetilkolin seviyesini arttıran asetilkolin transferaz aktivitesinin  $17\beta$ -estradiol ile arttığı saptanmıştır (67). Östrojen tedavisine başlama zamanıyla Alzheimer veya diğer demans türlerine yakalanma riski arasında bir ilişki görülmüştür. Menapoz aşamasında östrojen tedavisine başlayan ve 10 yıl süreyle tedaviye devam eden kadınlarda Alzheimer hastalığının gelişme riski 3 kat azalmıştır (109). Diğer taraftan, menapozu takiben 15-20 yıl sonra östrojen tedavisine başlayan kadınlarda Alzheimer hastalığının gelişme riskinin 2 kat arttığı saptanmıştır (89).

Postmenapozal kadınların yanısıra bazı hayvan modelleri üzerinde de steroid hormon etkilerine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Sıçanlara düşük

dozlarda uygulanan progesteronun, nöronal hasarın bir göstergesi olan hilar nöronların kaybını ve vimentin sentezini azalttığı gösterilmiş, ayrıca progesteronun kainik asit eksitotoksitesine karşı da hipokampal nöronları koruduğu saptanmıştır (28). Progesteronla karşılaştırıldığında sıçanlarda uzun süreli östrojen tedavisi, kardiyak ve iskemik beyin hasarına karşı profilaktik tedavide daha etkilidir (97). Ayrıca östrojen dışı sıçanlarda kan akışını düzenleyerek ve beyni koruyarak iskeminin ortaya çıkmasını engellemektedir (3, 61, 97).

Östrojen ve SERM'lerin nöroprotektif etki mekanizması net olarak açıklanamamış olsa da olası mekanizmalar şunlardır ve Şekil 3'te gösterilmiştir (62):

1. Gen transkripsiyonunu kapsayan genomik, östrojen reseptör aracılı yolak
2. Nongenomik sinyal yolağı; mitojenin aktive ettiği protein kinaz (MAPK) ve fosfatidilinositol-3-kinaz/protein kinaz B'nin (Akt) de içinde bulunduğu hücre içi ulakların aktivasyonu
3. Östrojenin özellikle farmakolojik dozlarında görülen serbest radikal temizleyicisi olduğu yolak (antioksidan etki)



**Şekil 3. Östrojen ve SERM'lerin olası nöroprotektif etki mekanizması (62)**

SERM'lerin de beyinde  $17\beta$ -estradiole benzer nörotrofik ve nöroprotektif etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır. Terapötik dozlarının üstündeki konsantrasyonlarda tamoksifen ve tamoksifenin minor metaboliti olan 4-hidroksi tamoksifenin, glutamat ve  $\beta$ -amiloidin neden olduğu nörotoksositeye karşı nöronları koruduğu saptanmıştır (73). Amerika Birleşik Devletleri'nde SERM'ler;  $\beta$ -amiloid, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve glutamatın neden olduğu nöronal hücre ölümüne karşı nöronları korumak amacıyla

reçetelendirilmektedir (62). Hipokampal nöronal hücre kültürlerinde tamoksifenin etkisi araştırılmış ve östrojenin nöroprotektif mekanizmasında rol aldığı bilinen antiapoptotik bir protein olan Bcl-2'nin ekspresyon düzeylerinin tamoksifen tedavisiyle arttığı gösterilmiştir (111).

Raloksifen kan-beyin engelini hem insanlarda hem de sıçanlarda geçebilmekte ve beyinde, östrojen reseptörleri üzerinde agonist/ antagonist etki göstermektedir (70). Raloksifenin nöronlardaki agonist/antagonist etkisi ortamda östrojen reseptörü agonisti bir bileşiğin olup olmamasına bağlıdır. Örneğin sıçan hipotalamusunda raloksifen tek başına dopamin içeriğini 2 kez artırırken,  $17\beta$ -estradiol varlığında antagonist gibi davranarak dopamin yapımını 5 kez azaltmaktadır (48). Raloksifenin nöronlardaki etkisi aynı zamanda doza da bağlıdır. Düşük konsantrasyonlarda nöronal membran hasarını azaltırken, yüksek konsantrasyonlarda hasarı arttırmaktadır. Subtoksik konsantrasyonlarda da glutamat,  $\beta$ -amiloid ve  $H_2O_2$ 'in neden olduğu nörotoksisiteye karşı nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (111). Diğer taraftan raloksifenin kadınlarda vazomotor fonksiyonların düzenlendiği bölgelerde östrojen reseptör antagonisti olarak görev yaptığı ve bu nedenle de sıcak basmasına neden olduğu gösterilmiştir (14, 30).

Bir başka SERM olan ICI 182,780'nin de hem antiapoptotik bir protein olan Bcl-2'nin ekspresyonunu hem de ERK-2'nin aktivasyonunu arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.  $17\beta$ -estradiolün nöroprotektif etkisini gösterebilmesi için ERK-2 ve Bcl-2'ye gereksinimi vardır (111).

### **1.1.2. Eksitotoksisite ve Nörodejenerasyon**

Eksitotoksisite, eksitatör amino asit reseptörlerinin aşırı uyarılmasına bağlı olarak hücre ölümünün meydana geldiği bir durumdur. Felç ve nörodejeneratif hastalıklardaki nöronal hasarın oluşmasında eksitotoksik stres önemli bir yere sahiptir (33). Örneğin glutamat ve glutamata bağlı eksitatör aminoasitlerin hem in vivo (33, 96) hem de in vitro (24, 59) uygulanması santral sinir sistemi nöronlarının ölümüne neden olmaktadır. Eksitotoksik hasarın mekanizması tam olarak anlaşılamasa da, eksitotoksisitenin hem nekrotik hem de apoptotik ölüm mekanizmalarını başlattığı ileri sürülmektedir. Glutamat ve glutamat reseptörleri beyindeki eksitotoksisiteden sorumludur. İyonotrofik glutamat reseptörlerinin 2 tipi vardır; bunlar N-metil-D-aspartat (NMDA) ve  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit (AMPA) reseptörleridir. Bu reseptörler öğrenme, hafıza (15) ve Parkinson (41) hastalığında oluşan eksitotoksisiteden sorumludur.

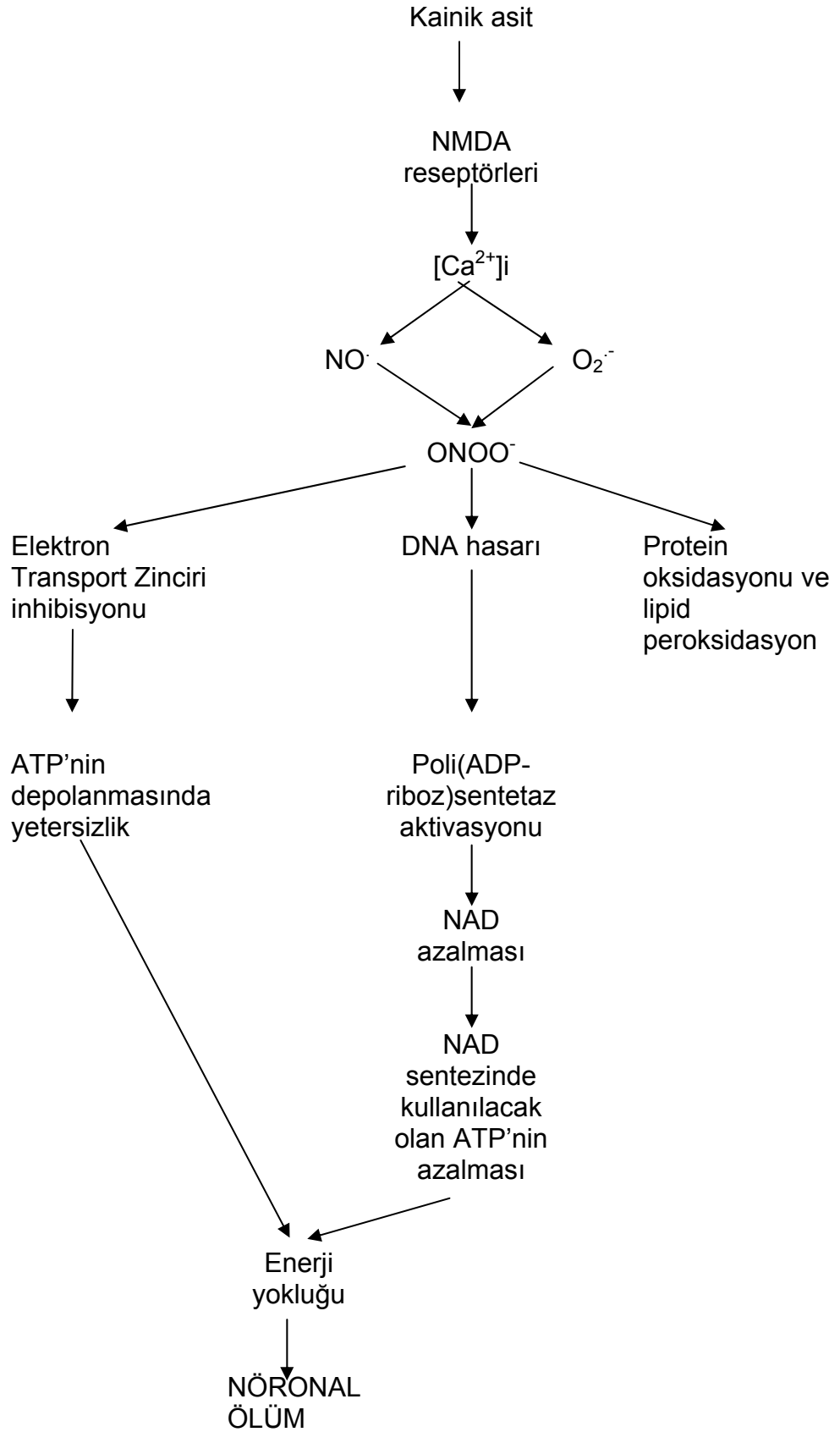
#### **1.1.2.1. Kainik Asit'in Nörodejenerasyondaki Yeri**

Kainik asit (KA), akut ve subakut epileptik aktiviteye neden olan potansiyel santral sinir sistemi eksitotoksinidir. Sadece sinir hücrelerinde değil aynı zamanda glia, miyelin kılıf ve kan damarlarında da geniş nöropatolojik değişimler meydana getirmektedir (96). KA'in beyinde lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonuna neden olduğu saptanmıştır. KA reseptörlerinin aktivasyonu da birçok beyin bölgesinde bulunan ve

antioksidan savunmada görev yapan glutatyon havuzlarının azalmasına neden olur (21). KA uygulaması ayrıca nöronal hasarın bir göstergesi olan hiler nöronların azalmasına ve vimentin sentezinin artmasına neden olmaktadır (28).

KA ve glutamik asit, aspartik asit gibi eksitatör aminoasitler etkilerini NMDA ve AMPA/ kainat iyonotrofik reseptörleri aracılığıyla göstermektedir (33, 78). Eksitotoksositeye aracılık eden iyonotrofik glutamat reseptörleri kalsiyumun hücre içine geçişine izin verir. Hücrelerde oluşan stres durumu, NMDA ve “kainat” kanallarının uyarılmasıyla ve uyarılma sonucunda hücre içine kalsiyum girişinin artmasıyla ilişkilidir (24, 59). Hücre içinde serbest  $Ca^{2+}$  düzeylerinin artışı, kalpainler (6, 7) ve nitrik oksit sentaz (36) gibi sinyal yollarının uyarılmasına neden olmaktadır. Fizyolojik konsantrasyonlarda hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve sinaptik aktivite için gerekli olan kalsiyum, yüksek konsantrasyonlarda hücre içinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini ve dolayısıyla da oksidatif stresi arttırmaktadır. Nitrik oksit yapımını takiben meydana gelen peroksinitrit radikali ( $ONOO\cdot$ ) oksidatif strese neden olur (8, 10). Oluşan serbest radikaller başta DNA olmak üzere protein ve lipidler gibi makromoleküllere saldırarak oksidasyona neden olmaktadır. Peroksinitrit radikali mitokondrial enerji sentezini inhibe ederek ATP kaybına öncülük etmekte ve nöronlarda enerji yokluğuna bağlı olarak hücre ölümüne neden olmaktadır (Şekil 4).

Eksitotoksik ajan vasıtasıyla hücre içindeki  $Ca^{2+}$ 'nin artışı, kalsiyumun mitokondride birikmesine neden olur ve birikme sonucunda mitokondri fonksiyonunu kaybeder. ROS üretimi artar ve apoptoziste yer alan kaspazların aktivasyonunu sağlayan proapoptotik faktörler mitokondriden salınır.



**Şekil 4. Kainik asitin nörodejeneratif etki mekanizması**



### 1.1.3. Glutasyon (GSH)

Oksidatif stres, hücrelerde serbest radikal oluşumunun sürekliliği ile antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozularak serbest radikal düzeylerinin arttığı durumdur. Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $HO\cdot$ ) gibi organik olmayan moleküllerle alkoksil ve peroksil radikalleri gibi organik moleküllere reaktif oksijen türleri (ROS) adı verilir. ROS, oksidatif metabolizma süresince meydana gelmekte ve vücutta lipid peroksidasyonu, protein modifikasyonu ve DNA zincir kırılmaları gibi çeşitli hasarlara sebep olmaktadır (21, 40, 56). Hücrelerde ROS'un oluşturduğu hasardan korunmak için enzimatik ve enzimatik olmayan bazı mekanizmalar bulunmaktadır.

Beyin dokusu diğer dokularla karşılaştırıldığında ROS oluşumu ve detoksifikasyonu açısından dezavantajlara sahiptir:

1. Vücudun ağırlık olarak %2'sini kaplamasına rağmen vücutta tüketilen oksijenin %20'si beyinde harcanmaktadır (40, 91).

2. Beyinin bazı bölgelerinde ROS oluşumunu tetikleyen demir ( $Fe^{2+}$ ) elementinin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu saptanmıştır (45).

3. Beyin lipid peroksidasyonuna yatkın olan doymamış yağ asitlerini yüksek oranda içermektedir (83).

4. Ayrıca beyin dokusu karaciğer ve böbrekle karşılaştırıldığında daha düşük seviyelerde süperoksit dismütaz, katalaz ve glutasyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzim aktivitesine sahiptir (40, 51).

ROS'un sebep olduğu oksidatif stresle nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde rastlanan nöron kayıpları arasında bir ilişki saptanmıştır (40). Bu

verilere dayanarak beyin fonksiyonları için antioksidan sistemin önemi bir kez daha vurgulanmalıdır.

Beyindeki ROS'un detoksifikasyonunda GSH önemli bir yere sahiptir. Thippeswamy ve arkadaşlarının (99) yaptığı çalışmada  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz inhibitörü uygulanarak sıçanlarda GSH sentezi baskılanmış ve bunun sonucunda beyinde mitokondrial hasar gözlenmiştir. Parkinson hastalarında da beyinde GSH düzeylerinin düşük olduğu saptanmıştır (90, 95).

### **1.1.3.1. Glutatyonun Fonksiyonları**

Suda çözünebilen bir tripeptid olan glutatyon ( $\gamma$ -glutamil-L-sisteinilglisin) memeli hücrelerinde 12 mM konsantrasyona kadar bulunmaktadır. Glutatyon bir antioksidandır, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda görevlidir. İzomerizasyon reaksiyonlarında kofaktör olarak görev yapar ve sisteinin depo ve taşıma şeklidir (32, 40, 100). Glutatyon ayrıca hücre çoğalmasında önemlidir (82) ve ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere indirgenmesini sağlar (100).

Yüksek konsantrasyonlardaki glutatyon, ROS'a karşı hücrel savunmada oldukça önemlidir. GSH nonenzimatik olarak radikallerle etkileşir (104) ve glutatyon peroksidazın peroksitleri indirgemesinde elektron vericisi olarak görev yapar (100).

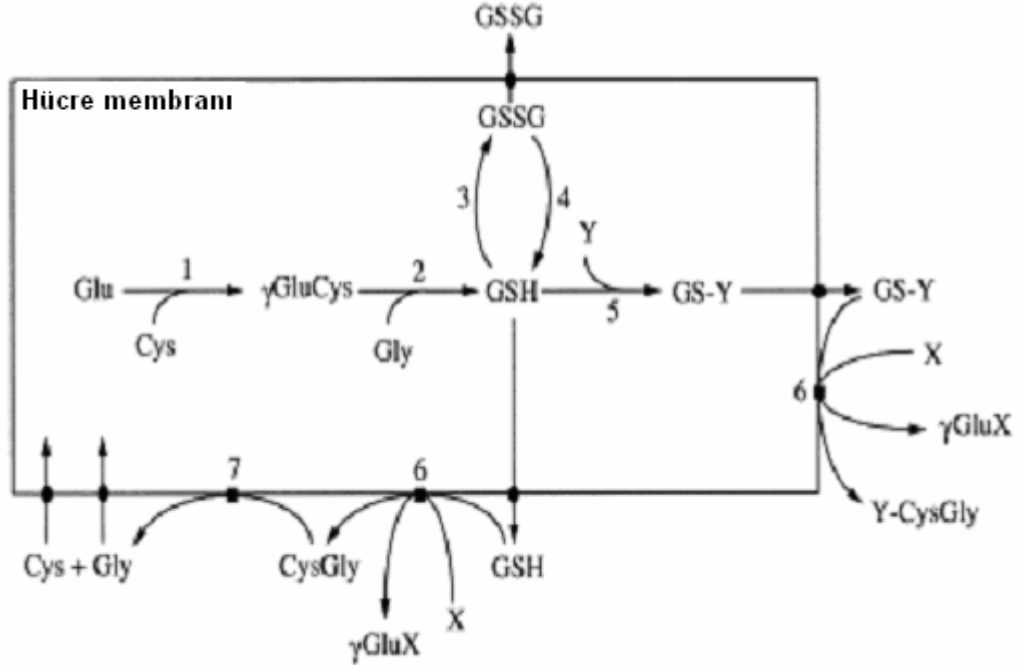
### 1.1.3.2. Glutasyon Sentezi

GSH sentezi iki enzimin kataliziyle gerçekleşmektedir. Bunlardan ilki  $\gamma$ -Glutamilsistein sentetazdır. Bu enzim glutamat ve sisteini birleştirerek bir dipeptit olan  $\gamma$ -glutamilsisteini oluşturur. İkinci enzim olan glutasyon sentetaz da  $\gamma$ -glutamilsistein ile glisini birleştirerek glutasyon oluşumunu sağlamaktadır. Her iki enzimin de çalışabilmesi için ATP'ye ihtiyaç vardır. Hücre içi GSH düzeyi, son ürün GSH'un geri bildirim (feedback) mekanizmasıyla  $\gamma$ -glutamilsistein sentetazı inhibe etmesiyle sabit tutulur. Bu nedenle GSH'un hücrenel sentezi ve tüketimi bir denge halindedir (40).

### 1.1.3.3. Glutasyon Metabolizması

ROS'un detoksifikasyonu sırasında GSH iki tip reaksiyona girer. Bunlardan biri superoksit anyonu, nitrik oksit, hidroksil radikali gibi radikallerle enzimatik olmayan yolla etkileşmesi (94) diğeri de peroksitlerin indirgenmesinde GPx enziminin elektron vericisi olarak görev yapmasıdır. Tüm bu olaylar sonucunda GSH oksidasyona uğrayarak glutasyon disülfid (GSSG) haline geçer. GSSG de glutasyon redüktaz (GR) enzimi vasıtasıyla okside halden tekrar redükte hale döner. GR, NADPH'tan elektronları GSSG'ye transfer ederek GSH'u oluşturur. GPx ve GR enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda GSH seviyeleri azalmaz. Bunun yanında glutasyon-S-transferaz (GST) enzimiyle glutasyon-S-konjugatların oluşması veya hücrelerden GSH'un salınımı hücre içi GSH düzeyini düşürmektedir. Bu

sebepten GSH'un aminoasitlerle sentezinin yapılarak yeniden yerine konması gerekir (40).



**Şekil 5. Glutatyon metabolizması.** 1,  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz; 2, glutatyon sentetaz; 3, glutatyon peroksidaz; 4, glutatyon redüktaz; 5, glutatyon-S-transferaz; 6,  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz; 7, ektopeptidaz; X, substrat. (40)

#### 1.1.3.4. Glutatyon ve Beyin Dokusu

Glutatyonun homeostazisi beyindeki glutatyonu oluşturan aminoasitlerin geri dönüşümü ile sağlanmaktadır. Bunun yanında GSH'un beyinde sentezinin yapılabilmesi için başlangıç maddelerinin kan-beyin engelini aşabiliyor olması gerekmektedir. Dringen ve arkadaşları tarafından, beyin kapillerlerinde ve beyin endotelial hücrelerinde sodyuma bağımlı GSH

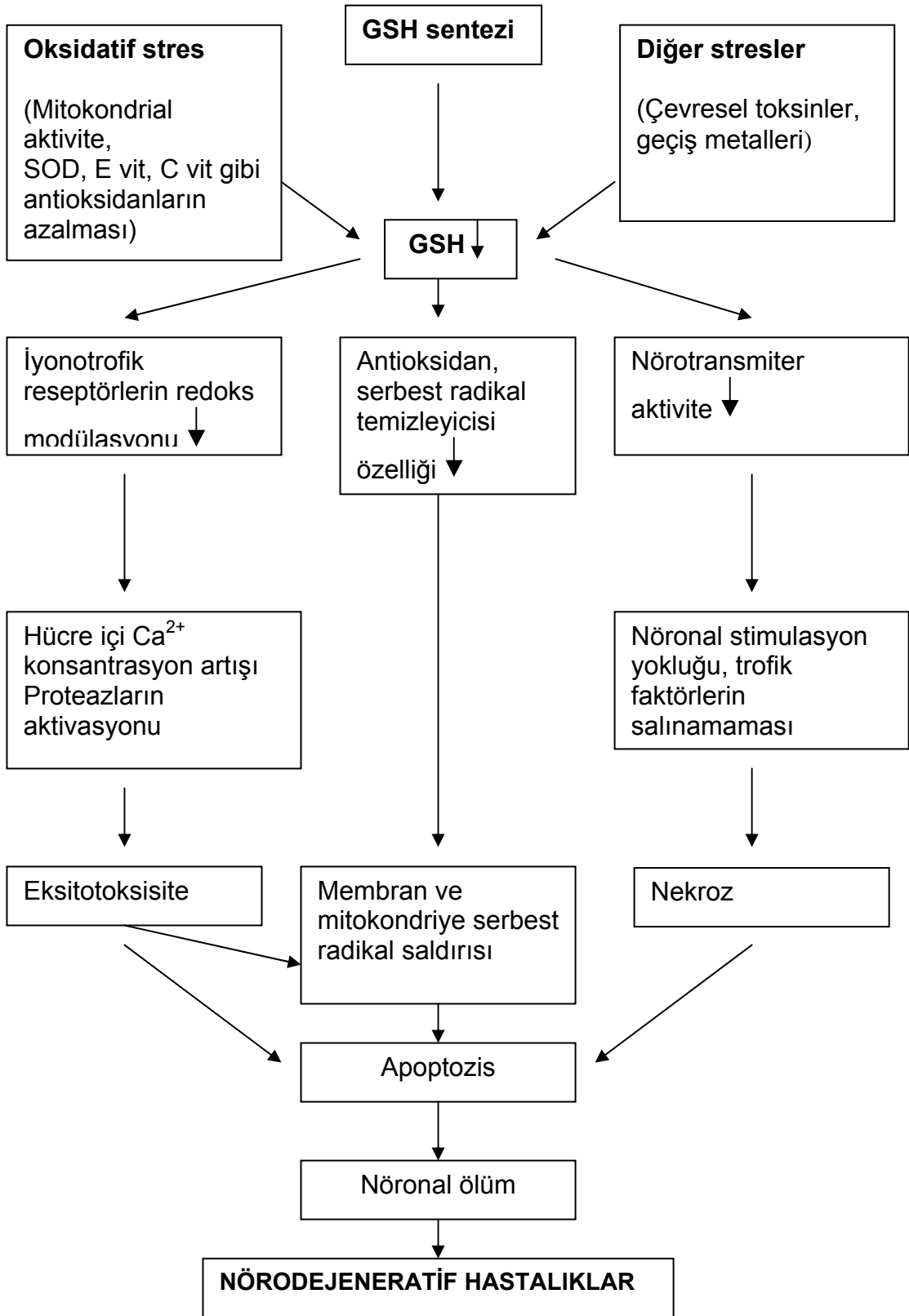
taşıyıcılarının olduğu saptanmıştır. Bu sistemler GSH'ı kandan beyine taşımakta ve beyinde GSH homeostazisini sağlamaktadır (40).

Glutasyonun beyin dokusundaki sentezi diğer dokularda olduğu gibi  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz ve glutasyon sentetaz enzimleriyle yapılmaktadır, fakat bu enzimlerin beyindeki aktiviteleri karaciğer ve böbrekteki aktivitelerine göre daha düşüktür (86). GSH'un beyindeki konsantrasyonu 1-3 mM arasındadır. Bununla beraber GSH prekürsörlerinden  $\gamma$ -glutamilsistein sıçan beynine uygulandığında beyin GSH düzeyi artmaktadır (18).

GSH'un beyinde sadece hücre içinde değil aynı zamanda hücre dışında da bulunması, stimulyasyonla beyin hücrelerinden salınması ve ekstraselüler reseptörlere spesifik olarak bağlanabilmesi GSH'un nörohormon olarak kabul edilmesine sebep olmaktadır (40).

#### **1.1.3.5. Glutasyon Düzeylerinin Değişimi ve Nörodejenerasyon İle İlişkisi**

ROS ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması başta yaşlılık olmak üzere birçok nörolojik bozukluğun oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Örneğin Parkinson hastalığında (PH) GSH sisteminde önemli değişiklikler saptanmıştır (40, 100). Parkinson, beyinde dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ile karakterize bir hastalıktır. Parkinson hastalarının beyin GSH içeriği kontrol grubuyla karşılaştırıldığında %40-50 oranında daha düşük bulunmuştur (91, 95). Düşük GSH içeriği PH sırasında oluşan oksidatif stresin ilk göstergesi olarak kabul edilmektedir. GSH yokluğuna bağlı olarak oluşan nörodejeneratif hastalıkların olası mekanizmaları Şekil 6'da gösterilmiştir.



**Şekil 6. GSH düzeylerinin değişimi ve nörodejeneratif hastalıkların altyapısını oluşturan olası mekanizmalar (4)**

Nörolojik hastalıkların patogeneğinde mitokondrinin önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (20). Nöronların korunması için özellikle mitokondrial GSH önemlidir. Hem sitozolik hem de mitokondrial GSH düzeylerinin azalması ETZ'de yer alan komplekslerin inhibisyonuna ve nöronal dejenerasyona sebep olmaktadır (87, 105). Bu nedenle azalmış GSH konsantrasyonu ve düşük ATP üretiminin oksidatif strese ve nöronal kayba neden olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte eksitotoksik bir ajan olan KA'in varlığının da beyinde GSH içeriğinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (21).

#### **1.1.4. NİTRİK OKSİT**

Nitrik oksit (NO), santral sinir sistemindeki en önemli sinyal iletim molekülüdür (74). NO'in bilinen ilk fonksiyonları sinir sisteminde nörotransmitter ve damar düz kaslarında gevşetici fonksiyonlarıdır. Serbest radikal özelliği nedeniyle oluşan nörodejeneratif, nöroenflamatuvar gibi patolojik etkilerinin yanında nöromodülasyon, nörotransmisyon ve sinaptik plastisite gibi fizyolojik etkileri de bulunmaktadır. NO oksijen radikalleriyle tepkimeye girerek hem kendisinin hem de tepkimeye girdiği radikal bileşiminin radikal özelliklerini sonlandırır. Bu özelliği nedeniyle NO tokoferol ve askorbik aside benzer bir antioksidan özellik taşır. Düzenleyici ve koruyucu etkilerinin yanında nitrik oksitin sitotoksik etkileri de bulunmaktadır. NO'in ne tür tepkimelere gireceğini ve biyolojik etkilerini, bulunduğu ortam ve buradaki konsantrasyonu belirlemektedir (74).

#### 1.1.4.1. Nitrik Oksit ve Nörodejenerasyon

Nitrik oksite bağlı nörodejeneratif ve nöroenflamatuvar bozuklukların asıl nedeni tam olarak bilinmese de iskemi ve reperfüzyon, Down sendromu, mitokondrial ensefalopatiler ve demansta oluşan beyin hasarında yüksek miktarlarda reaktif nitrojen türlerine rastlanmıştır (19, 36, 49).

NO'in üretimi nöronal (nNOS), endotelyal (eNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere 3 izoformu bulunan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-argininden hareketle gerçekleşmektedir (54). NOS izoformlarının üçü de beyindeki NO sentezinin potansiyel kaynaklarıdır. nNOS'ın aktivasyonu için hücre içi kalsiyum düzeyinin artması gerekir. Oluşan NO hücre membranlarından difüze olabildiği için sadece üretildiği hücrelerde değil aynı zamanda komşu hücrelerde de etkilidir.

NO, peroksinitrit ve nitrit gibi reaktif nitrojen türlerinin (RNS) birçok biyolojik etkisi bulunmaktadır. Endojen bir serbest radikal olan NO'in kardiyovasküler, bağışıklık ve sinir sisteminde kendine özgü fonksiyonları vardır (101). Aerobik ortamlarda NO'in sulu çözeltileri nitrite dönüşür (55, 103). Bunun yanı sıra NO, süperoksit anyonuyla birleşerek oldukça toksik olan peroksinitrit radikalini oluşturur. Oluşan peroksinitrit de hızla son ürün olan nitrit ve nitrate dekompoze olmaktadır (9, 79). Nitrit, NO'in parçalanma ürünü olmasına rağmen aynı zamanda asit ortamlarda NO'in oluşumuna katılmaktadır. Nitrat diyetle de vücuda alınmakta ve alınan nitratın yaklaşık %5'i tükrükteki bakterilerce nitrite çevrilmektedir (101).

Nitrit ve nitratın birçok tür için toksik olduğu bilinmektedir. Örneğin nitrit ve nitratın vücutta birikmesi methemoglobinemiye bağlı olarak ciddi

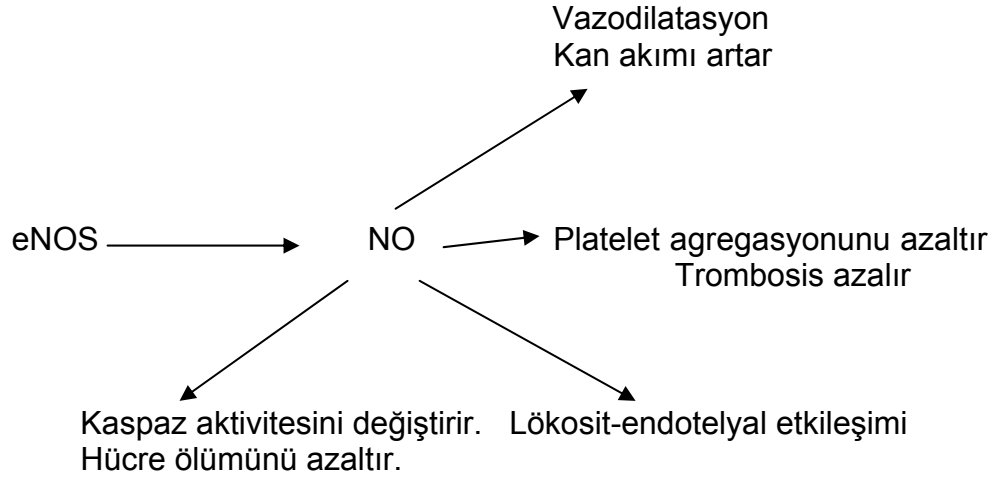


toksisiteye neden olmaktadır. Nitrit ve peroksinitritin dopaminin oksidasyonunu sağlayarak dopamini oldukça güçlü bir nörotoksin olan 6-hidroksidopamine çevirdiği gösterilmiştir (101). Nitrit ve nitratlar aynı zamanda insanlar tarafından tüketilen balık ve etlere tat ve renk vermek amacıyla kullanılmakta ve düşük pH'larda da vücuttaki aminlerle birleşerek karsinojen nitrozaminlerin oluşmasına sebep olmaktadır (69).

Nitrik oksitin protektif mi yoksa toksik etki mi göstereceği dokunun redoks durumuna, içerdiği NOS izoformlarının çeşidine ve süperoksit anyonu gibi türlerin dokudaki varlığına bağlıdır (54).

#### **1.1.4.2. Nitrik Oksit ve Nöroprotektif Mekanizma**

nNOS ve iNOS'ın toksik etkilerinin yanı sıra eNOS'ın serebral iskemiye karşı koruyucu etkisi bilinmektedir. eNOS nöroprotektif etkisini trombosit agregasyonunu inhibe ederek, endotelial lökosit adhezyonunu inhibe ederek ve vazodilatasyonu sağlayıp kan akımını artırarak göstermektedir (54). NO'in kardiyovasküler sistemde guanilat siklazı aktive edip cGMP oluşumunu arttırmak suretiyle vazodilatör bir etki gösterebileceğinin ortaya konması 1998 yılında ilgili araştırmacıların Nobel Ödülü'nü almasını sağlamıştır (Şekil 7).



**Şekil 7. Nitrik oksitin vasküler etkisi (54)**

NO, beyinde iki önemli sinyal iletim yolağıyla etkileşir. Bunlar Ras/ Raf/ MEK/ ERK yolağı ve PI3 kinaz Akt yolaklarıdır (54).

#### 1. Ras/Raf/ MEK/ERK Yolağı

nNOS'ın oluşturduğu NO bir protein olan Ras'ı aktive eder (23, 54). Bunun sonucunda Ras, Raf kinazlara bağlanarak hücre yüzeyine Raf-kinazların translokasyonunu sağlar. Raf proteinleri MEK kinazların fosforilasyonunu sağlayarak onları aktive eder. MEK-kinazlar da ERK-kinazlara fosfat katılmasını sağlar. ERK-kinazlar bu yolağın en etkili molekülleridir. ERK-kinazlar sadece sitoplazmik molekülleri değil aynı zamanda CREB ve Elk-1 gibi nükleer proteinleri ve transkripsiyon faktörlerini de aktive etmektedir. CREB bir transkripsiyon faktörüdür. Hafızayla ilişkili sinaptik plastisitenin sağlanmasında esas moleküldür. CREB'in aktivasyonu nöronal devamlılıkta ve nörodejeneratif hastalıklara karşı korunmada önemli bir faktördür. Raf/MEK/ERK yolağı da hücresel proliferasyonun, değişimlerin, hücre devamlılığının ve apoptozisin düzenlenmesinde temel yoldur (23, 54).

## 2. PI3 kinaz/Akt Yolağı

NO'in aktive ettiği Ras aynı zamanda PI3 kinaz/Akt yolağını da stimule eder. Bu stimulasyonla birlikte PI3 kinaz hücre membranına gelir ve fosfoinositidlerin oluşumunu sağlar. Fosfoinositidler de serin/ treonin kinaz Akt'yi aktive eder. Akt de eNOS'ın, transkripsiyon faktörlerinin, apoptozisle ilgili proteinlerin fosforilasyonunu sağlayarak hücre devamlılığında yer almaktadır (54). Akt'nin aşırı sentezlenmesi, eNOS'ı uyararak NO sentezini arttırmakta ve buna bağlı olarak da NO eksikliğinin sonucunda oluşan apoptozisten beyin hücrelerini korumaktadır (31).

Östrojen ve SERM'lerinin nöroprotektif mekanizmasında da NO'in nöroprotektif mekanizmasında olduğu gibi PI3 kinaz/ Akt yolağı rol oynamaktadır (111).

NO'in nöroprotektif etkisini gösteren birçok çalışma olmuştur. Bunlardan birinde dorsal kök ganglion nöronlarının sadece %5'inin yetişkin sıçanlarda normal koşullarda nNOS'ın sentezlediği gösterilmiştir. Periferal sinir lezyonlarını takiben bu proteinin sentezinin arttığı, hemen hemen tüm hücrelerin aynen embriyonik safhada olduğu gibi nNOS sentezini yaptığı saptanmıştır (99). Buradan hareketle nNOS'ın sentezinin herhangi bir travmatik durumu takiben arttığı gözlenmektedir. Aynı zamanda nNOS'ın inhibitörünün olduğu ortamda nöronların dejenerasyonun arttığı gösterilmiş (99) ve nNOS'dan yoksun farelerin nöronlarının ölüme daha yatkın olduğu saptanmıştır (60).

Bir başka çalışmada serebellar granül hücrelerin (CGC) költürü yapılmış ve hücre költürüne NO oluşumunun inhibisyonunu sağlamak amacıyla NOS inhibitörü eklenmiştir. Buna bağlı olarak CGC hücrelerinde apoptotik ölüm

gözlenmiştir (27). NO eksikliğine bağlı olarak oluşan apoptozis sadece kaspaz aktivitesiyle ilişkili değil aynı zamanda Bcl-2 gen ailesiyle de ilişkilidir. Çünkü serebellar hücre kültürüne NOS inhibitörü eklenince antiapoptotik gen Bcl-2'nin mRNA ve protein sentezinde de azalma gözlenmiş ve protein sentezindeki bozukluk ortama NO vericisi eklenince ters çevrilebilmiştir (26).

NO aynı zamanda NMDA reseptör aktivitesini düşürerek nöronları eksitotoksinlerin neden olduğu hasardan korumaktadır. NMDA reseptörlerinin redoks düzenleyici bölgesindeki tiyol kısımları NO tarafından nitrozillenerek disülfid haline getirilir ve NMDA reseptörlerinin aktivitesi azaltılır (2, 64).

NO'in bir diğer önemli özelliği de antioksidan kapasiteye sahip olmasıdır ve beyinde antioksidan etkiyi;

1. Demir iyonunun Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşturmasını engelleyerek,
2. Lipid peroksidasyon zincir reaksiyonuna müdahale ederek,
3. Glutasyonun antioksidan etkinliğine yardımcı olarak ,
4. Sistein proteazları inhibe ederek göstermektedir.

Oksidatif stres, hücrel antioksidanların ve beraberinde GSH düzeylerini beyin dokusunda azaltırken GSH ve NO'in birleşmesiyle meydana gelen ve GSH'dan 100 kez daha güçlü bir antioksidan olan S-nitrosoglutasyon düzeylerinin artmasına sebep olmaktadır. Buna bağlı olarak da nöronların ve diğer beyin hücrelerinin oksidatif stresten korunması sağlanmaktadır (23).

Kronik östrojen tedavisinin dişi ve erkek ratlarda eNOS protein seviyesini arttırdığı saptanmış ve bu nedenle de östrojenin nöroprotektif etkisinin eNOS'a bağlı olabileceği düşünülmüştür (72, 74). Östrojen eNOS'ın

sentezini stimule ederek NO yapımını arttırmakta ve beyin damarlarında önemli vazoaaktif özellikler göstermektedir. Yapılan bir çalışmada ratlarda overiektomi sonucunda azalan nitrit-nitrat seviyelerinin, östrojen ve raloksifen tedavisini takiben kontrol grubundaki nitrit-nitrat seviyelerine ulaştığı saptanmıştır (74). Raloksifenin beyin korteksinde, NO seviyeleri üzerindeki östrojene benzer etkisi, nöroprotektif etkiyle aslında östrojen reseptörlerinin ilgisi olabileceğini düşündürmektedir. Raloksifenin de NO yapımını eNOS'ı aktive ederek arttırdığı gösterilmiştir (17, 84, 92). Östrojen öğrenme ve hafıza üzerindeki yararlı etkilerini NO seviyelerini sabit tutarak göstermekte (74) ve bu durum beyinin öğrenme ve hafızadan sorumlu olan korteks kısmında gerçekleşmektedir.

#### **1.1.5. Bcl-2 Ekspresyonu ve Nöroprotektif Mekanizma**

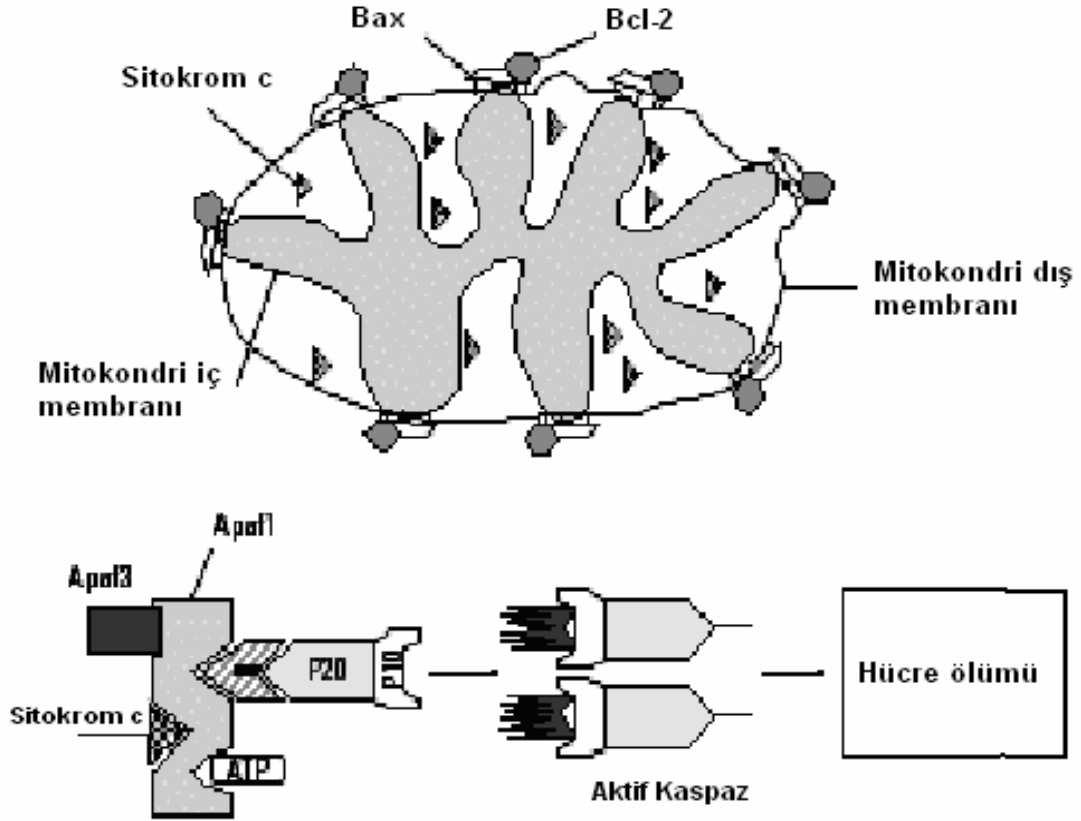
Apoptozis ve nekrozis hücre ölümüne yol açan 2 ana mekanizmadan biridir. Apoptozis, hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri programlı, aktif olarak RNA/protein sentezine ve enerjiye gereksinim gösteren fizyolojik ölüm biçimidir. Apoptozis embriyogenez, farklılaşma, normal hücre dönüşümü sırasında meydana gelebilir. Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozisin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan "intihar programını" aktive ederek kendilerini öldürdükleri düşünülmektedir.

Büyüme ve karsinogenezde etkili olan bazı genler apoptozisin başlatılmasında dengeleyici rol oynamaktadır. Oksidatif stres, mitokondriden

sitokrom c salınması, kaspaz proteazların aktivasyonu ve endonükleazların aktivasyonu gibi moleküler olaylar apoptozisi başlatabilmektedir.

Apoptozisin sürekli aktivasyonu ile AIDS, aplastik anemi, miyokard enfarktüsü gibi hastalıkların yanı sıra nörodejeneratif bozukluklar da meydana gelmektedir. Apoptozisin düzenlenmesinde Bcl-2 gen ailesi önemli rol oynar. Bu gen ailesindeki proteinler kaspaz aktivasyonunu düzenleyerek apoptozisi indükler ve antagonize eder. Mitokondriler apoptotik proteinlerin salınmasını sağlayarak hücre ölümünde düzenleyici rol oynar. Bcl-2 ailesine ait proteinler apoptozis ve nekrozis hallerinde mitokondrial değişimleri düzenler. Bcl-2 gen ailesi birbirine zıt etkileri olan 2 gruptan oluşur. Antiapoptotik grupta Bcl-2 ve Bcl-xL, proapoptotik grupta da Bax, Bak, Bad ve Bid bulunur (75). Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye yani hidrofobik cep ve amfipatik  $\alpha$ -heliks kısımlarına bağlıdır. Yapılarındaki BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri hidrofobik cebi oluşturur. Amfipatik  $\alpha$ -heliks BH3 bölgesinde yer alır. Bu proteinlerin yapılarındaki hidrofobik cep, ailenin üyelerinin bir diğer üyenin BH3 bölgesine bağlanmasına izin verir. Antiapoptotik üyelerde proapoptotik üyelerden farklı olarak BH4 bölgesi bulunur. Proapoptotik olanlar apoptozis-indükleyici faktör (AIF) ve sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesini indükleyerek apoptozisi başlatırken antiapoptotikler sitokrom c'nin salıverilmesini baskılayarak apoptozisi engeller (57, 80, 88). Proapoptotik üyelerin antiapoptotik üyelerle etkileşmesi halinde ise sitokrom c salıverilmesi gerçekleşir. Mitokondriden sitoplazmaya salıverilen sitokrom c de Apaf-1 (apoptotik peptidazları aktive edici faktör-1) ve ATP ile birleşerek apoptozomu oluşturur. Apoptozom oluşumu inaktif kaspazları aktive eder ve böylece hücre ölümü başlamış olur (Şekil 8). Bu

nedenle pro ve antiapoptotik üyelerin birbirine oranı hücrenin yaşam ve ölüm tercihini belirler. Bcl-2/Bax'ın oranının artması ya da azalması apoptozisin aktivasyonu ya da inhibisyonu ile sonuçlanır.



**Şekil 8. Bcl-2 ve Bax dimerleşmesi, apoptozom oluşumu**

Antiapoptotik düzenleyici protein olarak Bcl-2'nin güçlü nöroprotektif etkileri bulunmaktadır. Bcl-2'nin fazla sentezlendiği hücrelerin proapoptotik etkenlere karşı oldukça dirençli olduğu gösterilmiştir (57, 113). Dendritlerin dallanmasını ve hasar görmüş santral sinir sistemi nöronlarının yeniden oluşumunu sağlamaktadır (22). Hem yaşlanmada hem de nörodejeneratif hastalıklarda Bcl-2'nin sentezinin artması nöroprotektif yanıtın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (85, 102).

## BÖLÜM II

### GEREÇ VE YÖNTEM

#### 2.1. Kullanılan Aletler

Homojenizatör -B.Braun

Vorteks -Nuvemix

Otomatik pipetler -Brand Transperfette

Hassas terazi –Sartorius, Analytic A-200

Mikrosantrifüj –Labnet, Spectrafuge 24D

Manyetik karıştırıcı –Nüve, MK 318

-20°C derin dondurucu –Uğur

-80°C derin dondurucu –Sanyo Ultra Low

Spektrofotometre –Shimadzu, UV-1601

Termal Döngü Cihazı (Thermal cycler) –Techne, TC 512

UV Transilüminatör ve Biocapt bilgisayar yazılımı –Vilber Lourmat

Yatay elektroforez tankı –Thermo EC, EC330 Midicell Primo

Güç kaynağı –Thermo, EC250-90

Su Banyosu –Nüve, BM 302

pH metre –İnolab

Çalkalayıcı –Labnet, Orbit LS



## 2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

**5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit):** DTNB, Sigma Chemical Co. (USA)

**Tris-EDTA (TE) Tamponu:** AppliChem Bio. Syn. Services (Almanya)

**TRItidy G:** AppliChem Bio. Syn. Services (Almanya)

**Dietilpirokarbonat:** DEPC, AppliChem Bio. Syn. Services (Almanya)

**Taq polimeraz (rekombinant):** MBI Fermentas (Litvanya)

**Bcl-2 primerleri:** Thermo (A.B.D.)

**10X PCR Tamponu:** MBI Fermentas (Litvanya)

**25 mM MgCl<sub>2</sub>:** MBI Fermentas (Litvanya)

**GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus:** MBI Fermentas (Litvanya)

**6X Loading Dye (jel yükleme çözeltisi):** MBI Fermentas (Litvanya)

**10 mM dNTPs karışımı:** MBI Fermentas (Litvanya)

**RevertAid™ First Strand cDNA Sentez Kiti:** (Random hegzamer primer, 5X reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü, 10 mM dNTP karışımı, 200 U/μl M-MuLV revers transkriptaz) MBI Fermentas (Litvanya)

**Glikojen:** MBI Fermentas (Litvanya)

**Etidyumbromid:** AppliChem Bio. Syn. Services (Almanya)

**Agaroz:** Prona (İspanya)

**Tris(hidroksimetil)aminometan:** C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, Merck (Almanya)

**Etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu-2-hidrat: EDTA.2H<sub>2</sub>O,** Riedel-de Haen (Almanya)

**Glasiyel asetik asit:** CH<sub>3</sub>COOH, Merck (Almanya)

**Kloroform:** CHCl<sub>3</sub>, Merck (Almanya)

- Etanol:**  $C_2H_5OH$ , J.T. Baker (Hollanda)
- 2-propanol:**  $CH_3CH(OH)CH_3$ , Merck (Almanya)
- Raloksifen hidroklorür:** LY 139481, Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)
- Karboksimetil seluloz:** CMC, Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)
- Kainik asit:**  $C_{10}H_{15}NO_4$ , Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)
- Glutasyon:** GSH, Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)
- Çinko sülfat:**  $ZnSO_4$ , Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)
- Sodyum hidroksit:** NaOH, Merck (Almanya)
- Sülfanilamid:** Sigma-Aldrich (Wien,Avusturya)
- HCl:** Merck (Almanya)
- N-Etilendiamin:** Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)
- Potasyum dihidrojen fosfat :**  $KH_2PO_4$  Merck (Almanya)
- Dipotasyum monohidrojen fosfat :**  $K_2HPO_4$  Merck (Almanya)
- Disodyum monohidrojen fosfat:**  $Na_2HPO_4$  Merck (Almanya)
- Sodyum nitrit:**  $NaNO_2$  Merck (Almanya)
- FAD:** Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)
- NADPH:** Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)
- Nitrat redüktaz:** Boehringer Mannheim
- Sodyum nitrat:**  $NaNO_3$  Merck (Almanya)
- Siğır serum albumini:** BSA Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)
- Sodyum karbonat anhidr:**  $Na_2CO_3$  Merck (Almanya)
- Sodyum potasyum tartarat.4H<sub>2</sub>O:** Merck (Almanya)
- Bakır sülfat.5H<sub>2</sub>O:** Merck (Almanya)
- Folin-Ciocalteu's Fenol Reaktifi:** Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)
- Apirojen su:** Deva İlaç Sanayi (İstanbul)

### 2.3. Kullanılan Çözeltiler

#### 1. Glutasyon Tayininde Doku Homojenizasyonu için Kullanılan Çözelti

##### TCA çözeltisi ( %5'lik, 5 mM EDTA içeren):

93.05 g EDTA tartılarak içinde 5 g TCA bulunan 100 ml'lik balon jøjeye konuldu. Balon jöje distile suyla 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti +4°C'de saklandı.

#### 2. Nitrit, Nitrat Tayininde Doku Homojenizasyonu için Kullanılan Çözelti

##### Fosfat tamponu (0.05 M, pH=7):

1.7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tartıldı ve distile suyla 250 ml'ye tamamlandı. 2.2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  tartıldı ve distile suyla 250 ml'ye tamamlandı. 2/3 oranında  $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$  karıştırıldı ve pH 7'ye ayarlandı.

#### 3. Glutasyon Miktar Tayini için Kullanılan Çözeltiler

##### TE Tamponu (0.4 M):

300 ml 1 M stok TE tamponuna 200 ml distile su eklenerek 0.4 M TE tamponu elde edildi. pH=8.9 oluncaya kadar 1 N NaOH çözeltisiyle pH ayarlandı.

##### DTNB 10 mM (Etanol içinde):

0.396 g DTNB tartılarak distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

#### **4. Nitrit, Nitrat Tayini için Kullanılan Çözeltiler**

##### **Deproteinize edici çözelti (%5'lik ZnSO<sub>4</sub> + 1 N NaOH):**

40 g NaOH 1 L distile suda çözülerek 1 N NaOH çözeltisi hazırlandı. 5 g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 100 ml distile suda çözülerek %5'lik ZnSO<sub>4</sub> çözeltisi hazırlandı. Her iki çözeltilerden de eşit miktarlarda alınıp karıştırılarak taze deproteinize edici çözelti hazırlandı.

##### **Griess çözeltisi:**

I) 2.5 g sülfanilamid 250 ml 3 N HCl içinde çözüldü. 3 N HCl hazırlamak için 60.5 ml HCl 250 ml'ye distile su ile tamamlandı.

II) 50 mg N-etilendiamin 250 ml distile suda çözüldü.

I ve II no'lu çözeltiler eşit miktarda karıştırılarak taze Griess çözeltisi elde edildi.

##### **Nitrit standardı (10 µM):**

0.069 g NaNO<sub>2</sub> distile suyla 1 L'ye tamamlanarak 1 mM'lık nitrit stok standardı hazırlandı. Elde edilen bu stok çözeltilerden distile suyla 1/100'lük dilüsyon yapılarak 10 µM'lık çalışma standardı hazırlandı.

##### **Fosfat tamponu (100 mM pH=7.5):**

I) 17.799 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 1 L distile suda çözüldü.

II) 13.609 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 L distile suda çözüldü.

##### **FAD çözeltisi (0.2 mM):**

16.59 mg FAD 100 ml distile suda çözüldü. Bu çözelti çalışılacağı gün taze hazırlandı ve buz üzerinde bekletildi.

##### **NADPH çözeltisi (12 mM):**

10 mg NADPH 1 ml distile suda çözüldü. Bu çözelti çalışılacağı gün taze hazırlandı ve buz üzerinde bekletildi.

**Nitrat redüktaz (500 U/L):**

20 ünitelik liyofilize toz 2 ml distile suda çözüldü. Daha sonra bu karışımdan 1/20 dilüsyonla 500 U/L'lik nitrat redüktaz elde edildi.

**Nitrat standartı (100 mM):**

84.59 mg  $\text{NaNO}_3$  10 ml distile suda çözüldü ve 100 mM'lık nitrat standartı elde edildi.

**5. Protein Miktar Tayini için Kullanılan Çözeltiler****Protein standartı:**

1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde BSA çözeltisi hazırlanarak 20-120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik standartlar için gerekli dilüsyonlar distile su ile yapıldı.

**%2'lik sodyum karbonat çözeltisi (%2  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ):**

2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlandı.

**%2'lik sodyum potasyum tartarat çözeltisi (%2 Na-K tartarat):**

2 g Na-K tartarat distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

**0.1 N NaOH çözeltisi:**

0.4 g NaOH distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

**%1'lik bakır sülfat çözeltisi (%1  $\text{CuSO}_4$ ):**

1 g  $\text{CuSO}_4$  distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

**Taze Alkali Bakır çözeltisi:**

Taze hazırlanmış %2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisine 1 ml %2'lik Na-K tartarat ve 1 ml %1'lik  $\text{CuSO}_4$  çözeltileri eklenerek taze olarak hazırlandı.

**Folin-Ciocalteu's Fenol çözeltisi:**

Kullanılacağı gün taze olarak 1:1 oranında distile suyla seyreltildi.

## **6. Bcl-2 Ekspresyonunun Tayini için Agaroz Jelin hazırlanması**

### **Agaroz %1.7:**

150 ml 1XTAE tamponunda 2.55 g agaroz çözüldü. Isıtıcıda jel kıvamına gelene kadar bekletildi.

### **TAE Tamponu 10X:**

1 L'de 48.4 g Tris, 11.4 ml glasiyel asetik asit, 20 ml 0.5 M EDTA içeren pH'sı 7.6 olan çözeltilidir.

### **0.5 M EDTA:**

186.1 g/L EDTA içeren pH'sı 8 olan çözeltilidir.

### **Dietilpirokarbonat-su (DEPC-su) (1 L):**

1 ml DEPC ve 999 ml distile su karıştırıldı. 24 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılarak inkübe edildi. Daha sonra otoklavda sterilize edildi. Buzdolabında +4°C'de saklandı.

## **2.4. Çalışma Grupları**

### **2.4.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Gruplandırılması**

Deneyde 300-350 g ağırlığında dişi Sprague-Dawley sıçanlar kullanıldı. Tüm hayvanlar 12 saat gece 12 saat gündüz döngüsü olacak şekilde deney gününe kadar bekletildi. Hayvanlar 4 aylık olunca Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda sodyum pentobarbital anestezisi altında, östrojen düzeylerini düşürmek amacıyla yumurtalıkları çıkarılarak overiektomi işlemi gerçekleştirildi. Overiektomiden 5 hafta sonra deney hayvanları 3 gruba ayrıldı:

Grup I- Overiektomize kontrol grubu (n=6) : Bu gruba 12 gün süreyle günlük 1 ml/kg olacak şekilde deri altına (s.c.) %1'lik karboksimetil seluloz verildi.

Grup II- Raloksifen grubu (n=6) : Bu gruba 12 gün süreyle günlük 1 mg/kg olacak şekilde deri altına raloksifen hidroklorür verildi.

Grup III- Raloksifen + KA grubu (n=6) : Bu gruba 12 gün süreyle günlük 1 mg/kg (74) olacak şekilde deri altına raloksifen hidroklorür verildi. Aynı zamanda deney günü (106) 1 saat arayla 7'şer mg/kg olacak şekilde iki kez KA intraperitoneal (i.p) olarak verildi.

12 gün süreyle raloksifen hidroklorür uygulanan 6 hayvana deney günü KA verildi ve KA verilen hayvanlar 3 saat boyunca gözlem altında tutularak (106) epileptik nöbetlerin şiddeti ve davranışlarındaki farklılıklar takip edildi. Hayvanların hiçbirinde şiddetli limbik konvulsiyonlar gözlenmedi. Bu grupta, ilk KA enjeksiyonunun takibinde, 40-50 dakika içinde önce hipoaktivite devamında hiperaktivite olacak şekilde orta şiddette semptomlar gözlemlendi. Aynı hayvanlara ikinci doz KA uygulanmasıyla hayvanlarda şiddeti artan nöbetler ve "ıslak köpek silkinmesi" (wet dog shake) saptandı. 3 saatin sonunda gruptaki tüm sıçanlar dekapite edildi ve beyin korteksleri buz üzerinde ayrıldı. Beyin korteksi örnekleri deney gününe kadar -80°C'de saklandı.

Elde edilen örneklerle sırasıyla şu deneyler yapılmıştır;

- Glutasyon miktar tayini
- Nitrit-nitrat düzeyi tayini
- Total RNA izolasyonu
- Total RNA konsantrasyonunun belirlenmesi

- Reverse Transkripsiyon yöntemiyle cDNA (complementary DNA) sentezi
- Bcl-2 genine ait primerler ile cDNA PCR amplifikasyonu
- PCR amplifikasyonunun agaroz jel elektroforezi ile doğrulanması
- UV görüntüleme cihazı ile agaroz jel üzerindeki Bcl-2 genine ait DNA bantlarının görüntülenmesi-fotoğraflanması
- Biocapt bilgisayar yazılımı ile Bcl-2 ekspresyonunun kantitatif olarak değerlendirilmesi

## **2.5. Kullanılan Yöntemler**

### **2.5.1. Örneklerin GSH Miktar Tayini İçin Homojenizasyonu**

Beyin korteksleri tartılarak +4°C'de 5 mM EDTA içeren %5'lik TCA çözeltisi ile homojenizatörde 1500 rpm'de homojenize edildi. Tüm örnekler +4°C'de 15000xg'de 10 dk. süreyle santrifüj edildi ve supernatantlar ayrıldı. Deneylere supernatantlar kullanılarak devam edildi.

### **2.5.2. GSH Miktar Tayini Yöntemi (68)**

Deney tüplerine 1.6 ml 0.4 M TE tamponu (pH=8.9) koyuldu. Üzerine ayrılan supernatantlardan 0.4 ml eklenerek karıştırıldı. Karışıma 40 µl 10 mM DTNB ilave edildi. Tekrar karıştırıldı. Tüpler 5 dk. karanlıkta bekletildi ve spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda absorban ölçüldü. Her örnek için 2 kez ölçüm yapıldı. Beyin korteksi GSH miktarları daha önceden



konsantrasyonu bilinen GSH çözeltileriyle hazırlanan standart eğri grafiği yardımıyla hesaplandı. GSH miktarı nmol/g protein olarak gösterildi.

### **2.5.3. GSH Miktar Tayini Belirlenmesinde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması**

Molekül ağırlığı 307.3 olan GSH'tan 30.7 mg tartıldı. Distile suyla 100 ml'ye tamamlandı. Böylece ana stok GSH standardı (1000 nmol/ml) hazırlandı. Bu stok çözeltiden alınan belirli hacimler 1 M Tris-HCl tamponu (pH=8.3) ile seyreltilerek ml'de 10, 20, 30, 50, 75 nmol GSH taşıyan standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden alınan 0.4'er ml, içinde 1.6 ml 0.4 M TE tamponu (pH=8.9) bulunan tüplere aktarıldı. Karıştırıldı. Üzerine 40 µl 10 mM DTNB ilave edilerek 5 dk. karanlıkta bekletildi. Spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü. Her standart örneği için 2 kez ölçüm yapıldı. Okunan absorbans değeri ve GSH konsantrasyonu arasında standart bir grafik hazırlandı.

### **2.5.4. Protein Miktar Tayini Belirlenmesinde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması**

50 mg sığır serum albumini (BSA) tartıldı. Distile suyla 50 ml'ye tamamlandı. Böylece ana stok protein standardı (1 mg/ml) hazırlandı. Bu stok çözeltiden alınan belirli hacimler distile su ile seyreltilerek ml'de 10, 20, 30, 40, 50, 75 µg protein taşıyan standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden alınan 0.4'er ml üzerine 2 ml taze alkali bakır çözeltisi eklendi.

Karıştırıldı. Tüpler 15 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra üzerlerine 1:1 oranında seyreltilmiş 0.2 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. 1 saatin sonunda 0.4 ml distile su, 2 ml taze alkali bakır çözeltisi ve 0.2 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi içeren köre karşı 750 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü. Her standart örnek için 2 kez ölçüm yapıldı. Okunan absorban değeri ve protein konsantrasyonu arasında standart bir grafik çizildi.

### **2.5.5. Protein Miktar Tayini Yöntemi**

Dokuların protein içeriği Lowry yöntemiyle ölçüldü (66). Bu yöntemin prensibi proteinlerin alkali ortamda bakır iyonları ile Biüret tepkimesi vermesidir. Alkali çözeltide önce peptid bağları ve bakır tuzları mor renkli bir kompleks oluşturur. Daha sonra Folin-Ciocalteu reaktifinin eklenmesiyle protein yapısındaki tirozin ve triptofan aminoasitleri de indirgenir ve renk oluşumuna katkıda bulunur. Homojenizasyon sonrası elde edilen homojenatlardan 0.4'er ml tüplere aktarıldı. Üzerine 2 ml taze alkali bakır çözeltisi eklendi. Karıştırıldı. Tüpler 15 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra üzerlerine 0.2 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. 1 saatin sonunda 0.4 ml distile su, 2 ml taze alkali bakır çözeltisi ve 0.2 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi içeren köre karşı 750 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü. Her örnek için 2 kez ölçüm yapıldı. Beyin korteksi protein miktarları daha önceden konsantrasyonu bilinen BSA çözeltileriyle hazırlanarak tespit edilmiş standart eğri grafiği yardımıyla hesaplandı.

### 2.5.6. Örneklerin Nitrit-Nitrat Miktar Tayini için Homojenizasyonu

Beyin korteksleri tartılarak +4°C'de 1:10 (w/v) pH'sı 7 olan 50 mM fosfat tamponu ile homojenizatörde buz üzerinde 1500 devirde homojenize edildi. Tüm örnekler +4°C'de 3000xg'de 10 dk. süreyle santrifüj edildi ve supernatantlar ayrıldı. Supernatantlar 1 N NaOH ve %5'lik ZnSO<sub>4</sub> içeren çözelti ile proteinlerinden uzaklaştırıldı.

### 2.5.7. Nitrit Miktar Tayini Yöntemi

Beyin kortekslerindeki nitrit tayini esas olarak Griess reaksiyonunu içeren kolorimetrik bir yöntemle gerçekleştirilmiştir (16). Nitritin asit ortamda sülfanilamid ile diazotizasyona uğratılması sonucu diazonyum tuzu oluşmaktadır. Bu tuz daha sonra N-etilendiamin ile eşleşerek 540 nm dalga boyunda kırmızı bir bileşik oluşturmaktadır. Nitrat ise sülfanilamid ile diazotizasyona uğramadığı için öncelikle nitrite indirgenmeli daha sonra Griess reaksiyonuna sokulmalıdır.

1 N NaOH ve %5'lik ZnSO<sub>4</sub> içeren çözelti ile proteinlerinden uzaklaştırılan örnekler 3000xg'de 15 dk. santrifüj edildi. Elde edilen supernatanttan 0.5 ml alınarak üzerine 0.5 ml Griess çözeltisi eklendi. 10 dk. sonra oluşan renk 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı okundu. Her örnek için 2 kez ölçüm yapıldı. Nitrit değerleri çizilen standart grafikten hesaplandı (nmol/mg protein).

### 2.5.8. Nitrat Miktar Tayini Yöntemi

Beyin kortekslerindeki nitrat miktar tayini için nitrat redüktaz yöntemi kullanılmıştır (16). Nitrat redüktaz enzimi aracılığıyla  $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotid ( $\beta$ -NADPH), NADP'ye yükseltgenir. Bu reaksiyon sırasında  $\beta$ -NADPH kullanımına bağlı miktardaki azalma 340 nm dalga boyunda ölçülmektedir. İşlemlere başlamadan önce doku homojenatlarının eşit miktarda deproteinizasyon çözeltisi ile deproteinize edilmesi gerekmektedir. 3000xg'de 15 dk. santrifüj edilen örneklerin supernatantları ayrılmakta ve nitrat tayini için kullanılmaktadır.

Nitrat tayininde kullanılan bileşikler ve miktarları Tablo I'de gösterilmiştir:

**Tablo I. Nitrat tayini aşamaları**

Bileşikler	Örnek	Örnek Körü	Reaktif Körü	Enzimli Reaktif Körü
Fosfat Tamponu	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l
FAD	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
$\beta$ -NADPH	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Nitrat redüktaz	40 $\mu$ l	-	-	40 $\mu$ l
Distile su	50 $\mu$ l	90 $\mu$ l	190 $\mu$ l	150 $\mu$ l
Süpernatant	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	-	-

Reaksiyon karışımları karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 90 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede 340 nm'de distile suya karşı okundu. Her örnek için 2 kez ölçüm yapıldı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak verildi.

Hesaplama:

Her örneğin 340 nm'de okunan absorbansı ( $A_{\text{Ö}}$ ) örnek körünün absorbansından ( $A_{\text{ÖK}}$ ) çıkarılır. Bu absorbans değerinden reaktif körü absorbans değişimi ( $A_{\text{RK}}$ ) çıkartılarak  $\Delta A$  hesaplanır. Bulunan faktör ile  $\Delta A$  çarpılarak nitrat konsantrasyonu elde edilir.

Konsantrasyon ( C )=  $\Delta A \times \text{Faktör}$

$\Delta A = (A_{\text{ÖK}} - A_{\text{Ö}}) - A_{\text{RK}}$

Faktör =  $(V_{\text{T}}/V_{\text{Ö}}) \times (1/l) \times (1/ \epsilon_{340 \text{ nm}}) \times 10^3$

$V_{\text{T}}$  = total hacim

$V_{\text{Ö}}$  = örnek hacmi

$l$  = ışık yolu

$\epsilon$  =  $\beta$ -NADPH'in 340 nm'deki milimolar absorpsiyonu ( $6.22 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

$10^3$  = mmol/L'den  $\mu\text{mol/L}$ 'ye dönüşüm

Total nitrit-nitrat (NO) düzeyinin hesaplanması:

Griess reaksiyonu ile tayin edilen doku nitrit düzeyi ile ölçülen doku nitrat düzeyi toplandığında bulunan sonuç bize total nitrit-nitrat düzeyini vermektedir.

### 2.5.9. Beyin Korteks Dokusundan Total RNA İzolasyonu (25)

Total RNA izolasyonu için beyin kortekslerinden yaklaşık 100 mg 1.5 ml'lik ependorflara alındı. Üzerine 800  $\mu\text{l}$  TriTidy G çözeltisinden eklenerek

kalın uçlu enjektörle doku küçük parçalara ayrıldı. 5 µl glikojen ependorfa eklendi. İnce uçlu enjektörle 15 dk. süreyle homojenizasyon yapıldı. Homojenat üzerine %99'luk buzdolabında bekletilmiş kloroformdan 200 µl eklendi. Şiddetli bir şekilde çalkalandı. Vortekslendi ve 2 dk. bekletildi. 12000xg'de 15 dk. santrifüj edildi. Ependorftaki berrak kısım yani supernatant dikkatli bir şekilde alınarak temiz bir ependorfa aktarıldı. Supernatant üzerine buzdolabında bekletilmiş 400 µl 2-propanol ilave edildi ve karışım 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi. 12000xg'de 15 dk. santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı. Böylece ependorfun alt kısmında beyaz pellet şeklinde RNA elde edildi. Pellet üzerine buzdolabında bekletilmiş soğuk %70'lik etanolden 1 ml ilave edildi. Ependorflar 7500xg'de 10 dk. santrifüj edilerek üstte bulunan etanol dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Ependorflar kapatılmadan etanolün uçması için oda sıcaklığında 10 dk. bekletildi. Etanol tamamen uçurulduktan sonra ependorflara 20 µl DEPC-su ilave edilerek pipet ucuyla hafifçe karıştırılarak RNA ile DEPC-suyun karışması sağlandı. Ependorflar 2 dk. süreyle buzun üzerinde bekletildi. Daha sonra 55°C'lik su banyosunda 5 dk. bekletildi. Elde edilen total RNA'lar revers transkripsiyon yöntemi ile cDNA sentezinin yapılacağı zamana kadar -80°C'de saklandı.

#### **2.5.10. Total RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Total RNA izolasyonu yapılan örneklerdeki RNA konsantrasyonunun belirlenebilmesi için izole edilen RNA'lar 1:80 oranında apirojen suyla seyreltildi. Bunun için 1 µl RNA örneği ile 79 µl apirojen su 200 µl'lik PCR tüplerinde karıştırıldı. Karışımın absorbansı 260 nm ve 280 nm dalga

boylarında ölçüldü. RNA izolasyonunun kalitesinin belirlenmesinde A260/A280 oranı kullanıldı. Bu oranın 1.6-2 arasında olması izolasyonun doğru şekilde yapıldığını göstermektedir. Total RNA konsantrasyonu da aşağıdaki denklemden yararlanılarak tespit edildi.

Total RNA konsantrasyonu( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )= [A260 \* seyreltme faktörü (80) \* 40(RNA koeffiensi)] /1000

RT-PCR yöntemiyle cDNA sentezi aşamasında reaksiyona giren RNA miktarının tüm örneklerde eşit olması amacıyla tüm örneklerdeki RNA içeriği 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  olacak şekilde ayarlandı. Bunun için elde edilen stok RNA çözeltisinden 4  $\mu\text{l}$  kullanıldığından aşağıdaki denklemden yararlanıldı.

Hesapla bulunan total RNA kons. ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) \* 4  $\mu\text{l}$  RNA örneği = istenen RNA kons. (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) \* total hacim

Seyreltme için DEPC-su kullanıldı. Seyreltme için kullanılacak DEPC-su miktarı total hacimden 4  $\mu\text{l}$  çıkarılarak belirlendi ve 4  $\mu\text{l}$  RNA örneği bununla seyreltildi. Böylece cDNA sentezi için 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  RNA içeren çözeltiler hazırlanmış oldu.

#### **2.5.11. Total RNA'dan Revers Transkripsiyon Yöntemiyle cDNA Sentezi**

(106)

Reaksiyonun prensibi sırasıyla belli bir ısıda ikincil yapılarıdaki RNA'nın açılması; mRNA'nın gelişigüzel bir bölgesine primerin bağlanması; uygun sıcaklık, iyon yükü, pH ve sentez için gerekli nükleotidlerin varlığında primerlerin üzerinden mRNA'nın dizilimine uygun komplementer DNA'nın

sentezlenmesi ve yüksek ısıda enzimin inaktive edilerek reaksiyonun durdurulması şeklindedir.

cDNA sentezine sokulacak tüm örneklerdeki total RNA miktarı 1 µg/µl olacak şekilde seyreltilerek hazırlandı ve revers transkripsiyon yöntemiyle cDNA sentezlendi. cDNA sentezi için “RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit” (MBI Fermentas, Litvanya) kullanıldı. Bu kit ile RNA, revers transkriptaz enzimi yardımı ile tek iplikcikli cDNA'ya (komplementer DNA) çevrilmektedir. Bu yöntemde M-MuLV (Moloney-Murine Leukomia Virus) transkriptaz enzimi kullanılmıştır. cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve miktarları Tablo II'de verilmiştir.

**Tablo II. cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve miktarları**

<b>BİLEŞENLER</b>	<b>Miktarlar ( Hacim)</b>
Seyreltilmiş RNA örneği (1 µg/µl)	4.0 µl
Random hekzamer primer	1.0 µl
Deiyonize su	6.0 µl
5X reaksiyon tamponu	4.0 µl
Ribonükleaz inhibitörü	1.0 µl
10 mM dNTP karışımı	2.0 µl
M-MuLV revers transkriptaz (200 U/ µl)	1.0 µl
<b>TOPLAM:</b>	<b>20 µl</b>

Buz üzerinde seyreltilmiş RNA örneği, random hekzamer primer ve deiyonize su belirtilen miktarlarda 200 µl'lik PCR tüplerinde karıştırıldı. Tüpün



çeperinde kalan damlacıkların mikrosantrifüj yardımıyla tüpün alt kısmında toplanması sağlandı. Herhangi bir kontaminasyonun önlenmesi açısından proteinlerin denatürasyonu için tüpler 70°C'de 5 dk. inkübasyona bırakıldı. Karışım buz üzerine alındı. Daha sonra sırasıyla belirtilen miktarlarda 5X reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü ve 10 mM dNTP karışımı ilave edildi. Mikrosantrifüj yardımıyla çeperdeki damlaların tüpün alt kısmında toplanması sağlandı. Karışım, primerin RNA kalıbındaki uygun bölgelere bağlanması amacıyla 25°C'de 5 dk. inkübasyona bırakıldı. Ardından karışıma M-MuLV revers transkriptaz (200 U/ µl) enzimi ilave edildi. Mikrosantrifüjle örneklerin tüpün alt kısmında toplanması sağlandı. Tüpler termal döngü cihazına (thermal cycler) yerleştirildi. PCR programı 42°C'de 1 saat, 94°C'de 7 dk. olacak şekilde ayarlandı. 42°C'de 1 saat süreyle RNA'lar revers transkriptaz enzimi yardımı ile cDNA'ya dönüştürüldü. 94°C'de 7 dk. süreyle de revers transkriptaz enzimi inaktive edildi. Böylece total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleşmiş oldu. Oluşan cDNA örnekleri "PCR yöntemi ile cDNA'nın çoğaltılması" aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

#### **2.5.12. PCR ile cDNA Amplifikasyonu ve Bcl-2 Ekspresyon Düzeylerinin Saptanması (106)**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Yöntem nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. PCR; 94°C-98°C aralığında gerçekleştirilen denatürasyon, 37°C-65°C aralığında gerçekleştirilen

primerlerin bağlanması (annealing) ve 72°C'de gerçekleştirilen elongasyon aşamalarından oluşur ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır.

Bir önceki basamakta sentezlenen tek iplikçikli cDNA'lar sekans-spesifik primerlerin yardımıyla, PCR yöntemi kullanılarak amplifiye edildi. Bcl-2 geninin ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geninin belirlenmesi için primerler kullanıldı. Bcl-2 primerleri 5'- TCT GTG GAT GAC TGA GTA CCT GAA C- 3' forward (ileri) ve 5'-AGA GAC AGC CAG GAG AAA TCA AAC- 3' revers (geri) olacak şekilde dizayn edildi. Bu primer PCR amplifikasyonunda yaklaşık 129 bp'lik bir ürün oluşturmaktadır. GAPDH primerleri 5'-AAG GTC ATC CCA GAG CTG AA- 3' forward (ileri) ve 5'-ATG TGA GCC ATG AGG TCC AC- 3' revers (geri) olacak şekilde dizayn edildi. Bu primer de PCR amplifikasyonunda yaklaşık 338 bp'lik bir ürün oluşturmaktadır. PCR'da kullanılmak üzere primerlerin her biri 5 pmol olacak şekilde hazırlandı. cDNA amplifikasyonu için gerekli bileşenler ve miktarları aşağıda Tablo III'te belirtilmiştir.

**Tablo III. cDNA amplifikasyonu için gerekli bileşenler ve miktarları**

<b>BİLEŞENLER</b>	<b>Miktarlar ( Hacim)</b>
1/5 seyreltilmiş cDNA	2.0 µl
10X PCR tamponu	5.0 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4.0 µl
10 mM dNTP karışımı	1.0 µl
5 pmol forward primer	1.0 µl
5 pmol revers primer	1.0 µl
Deiyonize su	35.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/ µl)	0.5 µl
<b>TOPLAM:</b>	<b>50 µl</b>

cDNA örneklerini PCR reaksiyonuna sokabilmek için örnekler 1:5 oranında deiyonize suyla seyreltildi. Diğer taraftan 200 µl'lik PCR tüpüne 5 µl 10X PCR tamponu, 4 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTP karışımı, 1 µl forward primer, 1 µl revers primer ve 35.5 µl deiyonize su eklenerek bir karışım hazırlandı. Seyreltilmiş 2 µl cDNA örneği üzerine hazırlanmış olan karışım yani 47.5 µl ilave edildi. Son olarak 0.5'er µl Taq DNA polimeraz enzimi ilave edilerek tüpler derhal termal döngü cihazına yerleştirildi. Başlangıç denatürasyonu 94°C de 3 dakika ve bunu takiben toplam 30 döngü; 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 30 saniye bağlanma (annealing) ve 72°C'de 45 saniye zincir uzatımı (elongation) gerçekleştirilecek şekilde PCR programı oluşturuldu. PCR ürünlerinin varlığı daha sonra agaroz jel elektroforeziyle doğrulandı.

### **2.5.13. Agaroz Jel Elektroforezi**

Elektroforez tekniği moleküllerin sahip oldukları net elektrik yükleri ile bu moleküllerin bir elektriksel alan içindeki hareketlerini etkilemesi prensibine dayanır. Moleküllerin büyüklüklerine göre ayrılabilme özellikleri, jel elektroforezinin pek çok amaç için kullanımına olanak sağlamıştır. Nükleik asit fragmanlarının tanımlanması, saflaştırılması ve ayrılması için kullanılan en yaygın yöntem agaroz jel elektroforezidir. Bu nedenle çeşitli amaçlar için izole edilen DNA ve RNA'ların tanımlanabilmesi, olası bir kontaminasyonun kontrolü, hangi formda olduğunun belirlenebilmesi, büyüklüğünün saptanabilmesi için agaroz jel elektroforezi kullanılmaktadır.

Bcl-2 gen ekspresyonunun belirlenmesinde de, yatay agaroz jel elektroforez yöntemi (ThermoEC, Primo, Yatay Submarine Jel Elektroforezi) kullanıldı. %1.7'lik agaroz jel hazırlamak için 250 ml'lik erlenin içine 1.7 g toz agaroz tartıldı. Üzerine 0.5x TAE (Tris-asetat-EDTA tamponu) çözeltisinden 100 ml eklendi ve ısıtıcıda 30 dk. süreyle agarozun çözünmesi sağlandı. Jelin oda sıcaklığında 60°C'ye gelmesi beklendi. Taraklar hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek elektroforez tankına yerleştirildi ve ılık jel çözeltisi etrafı temiz bir bantla çevrilmiş yatay elektroforez tankına döküldü. Yaklaşık yarım saat kadar jelin tamamen donması için beklendi. Elektroforez cihazının tankına 0.5X TAE tampon çözeltisinden dolduruldu. Donmuş olan jelden taraklar dikkatlice çıkartıldı ve jel tanka yerleştirildi. PCR ürünlerinden 15 µl alındı ve ayrı bir PCR tüpünde 3 µl 6X Loading dye (jel yükleme çözeltisi) ile karıştırıldı. Her örnek için ayrı ayrı hazırlanan bu karışımlar kuyucuklara yüklendi. Elde edilecek bantın yerinin doğru tespit edilebilmesi için ilk kuyucuğa 7 µl GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (marker) yüklendi. Elektroforez işlemi, 75 V'luk potansiyel altında 1 saat 45 dakika süre ile oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

#### **2.5.14. Jelin Boyanması ve Görüntülenmesi**

Agaroz jel içindeki DNA'yı görünür hale getirmenin en uygun yolu, floresan özellikteki etidyum bromür boyasını kullanmaktır. Bu boya DNA'nın bazları arasına interkalasyon yapabilen, düzlemsel yapılı halkasal bir grup içerir. DNA tarafından absorblanan 254 nm dalga boyundaki UV ışığı boya molekülüne aktarılır. DNA'ya bağlı boyanın kendisi de 302-366 nm arasındaki

ışınları absorblar. Çevreye geri yayılan enerji, görünür ışık bölgesindeki (590 nm dalga boyunda) kırmızı-turuncu ışıktır. Böylece jeldeki DNA bandı görünür hale gelir. Etidyum bromür hem tek ve çift zincirli DNA'yı hem de RNA'yı gözlemek için kullanılabilir. Ancak bu boyanın tek zincirli nükleik asit moleküllerine karşı ilgisi daha azdır.

Elektroforez işleminin ardından jel bir kap içine alındı ve üzerine 200 ml distile su döküldü. Bantların UV ışık altında görünür hale gelebilmesi için distile suya 10 mg/ml stok etidyum bromür çözeltisinden 20 µl ilave edildi ve jel oda sıcaklığında 20 dk. süre ile çalkalayıcıda boyandı. Boyama işleminden sonra jel distile suyla yıkandı. Jel üzerinde oluşan bantlar, UV ışık altında görüntülendi ve bantların fotoğrafı çekildi. Agaroz üzerinde görünen her bir bant hedef gen Bcl-2'nin 129 bp büyüklüğündeki amplifikasyon ürünüdür.

#### **2.5.15. Bcl-2 Ekspresyon Düzeylerinin Dansitometrik Analizi**

Bcl-2'nin gen ekspresyonunun kantitatif olarak saptanmasında GAPDH geni (338 bp) standart olarak kullanılmıştır. Bcl-2 ve GAPDH genlerine ait bantların UV translüminatörde görüntülenmesini takiben bilgisayarda Biocapt yazılımı kullanılarak dansitometrik analiz yapılmıştır.

#### **2.6. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi**

Sonuçların değerlendirilmesinde Windows SPSS 9.0 programında Tek Faktörlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA), Pearson korelasyon istatistik

yöntemleri kullanılmıştır. İstatistiksel farkın belirlenme aralığı olarak  $p<0.05$  kabul edilmiştir.

## **2.7. Etik Kurul Onayı**

Çalışma başlangıcında, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2004/6 sayılı ve 04.11.2004 tarihli bir yazıyla söz konusu çalışma için onay alınmıştır.

### BÖLÜM III

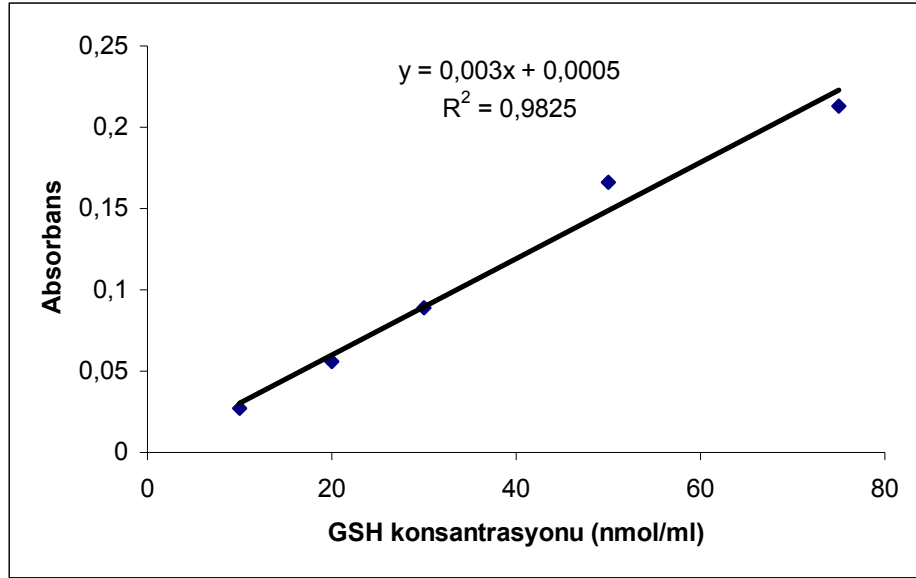
### BULGULAR

#### 3.1. GSH Miktar Tayini İçin Standart Eğri Çizimi

Çeşitli konsantrasyonlarda GSH taşıyan çözeltilerin spektrofotometredeki absorbans değerleri Tablo IV'te sunulmuş ve Şekil 9'da değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

Tablo IV. GSH standart grafiğini oluşturan absorbans değerleri

Glutasyon(GSH) (nmol/ml)	Absorbans Ortalama $\pm$ S.H.
10	0.027 $\pm$ 0.0006
20	0.056 $\pm$ 0.0002
30	0.089 $\pm$ 0.0002
50	0.166 $\pm$ 0.0002
75	0.213 $\pm$ 0.0004



**Şekil 9. GSH absorbans- konsantrasyon eğrisi**

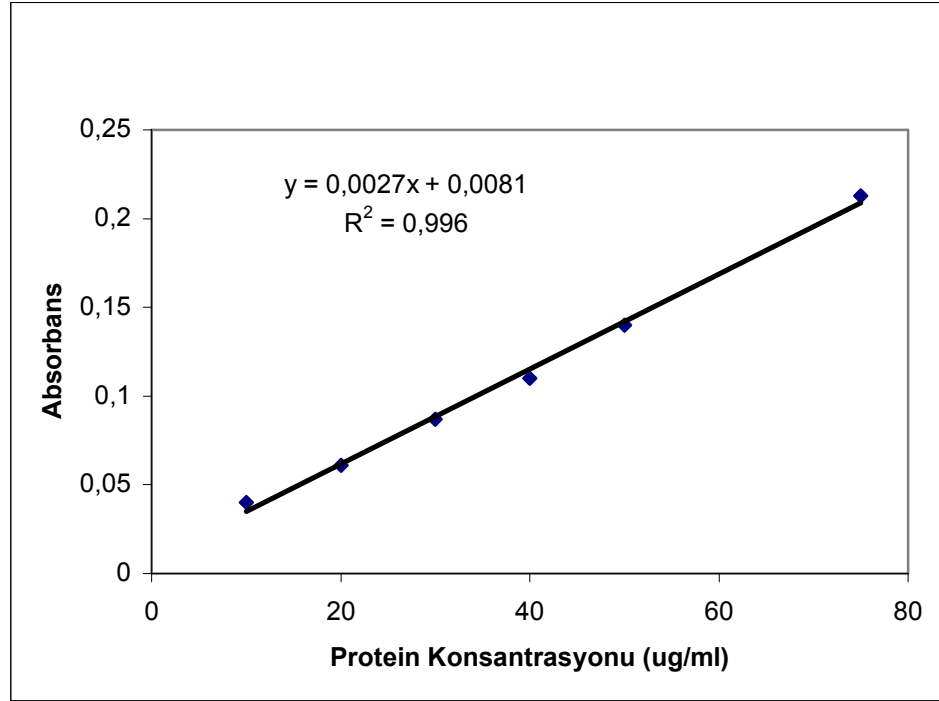
### 3.2. Protein Miktar Tayini İçin Standart Eğri Çizimi

Çeşitli konsantrasyonlarda BSA içeren çözeltilerin spektrofotometredeki absorbans değerleri Tablo V'te sunulmuş ve Şekil 10'da değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

**Tablo V. BSA standart grafiğini oluşturan absorbans değerleri**

$\mu\text{g protein/ ml}$	Absorbans Ortalama $\pm$ S.H.
10	0.040 $\pm$ 0.0003
20	0.061 $\pm$ 0.0002
30	0.087 $\pm$ 0.0002
40	0.111 $\pm$ 0.0002
50	0.140 $\pm$ 0.0003
75	0.213 $\pm$ 0.0003





**Şekil 10. Protein absorbans- konsantrasyon eğrisi**

### 3.3. Beyin Korteks Doku Örneklerinde GSH Düzeyleri

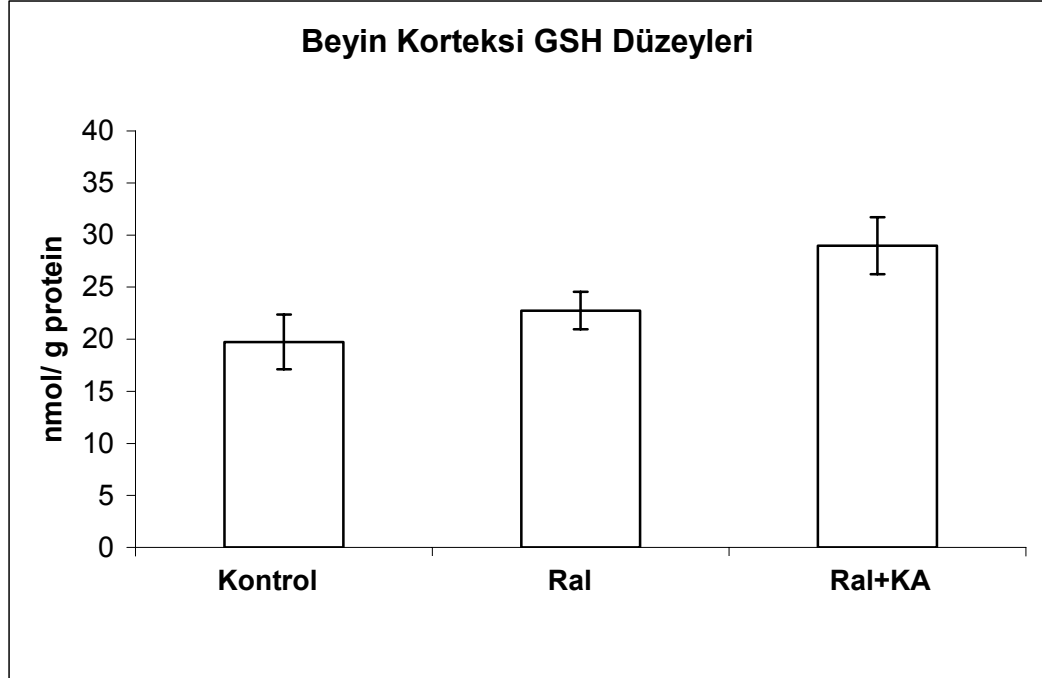
Overiektomize kontrol, Raloksifen ve Raloksifen + KA gruplarına ait beyin korteks örneklerinde elde edilen GSH düzeyleri (nmol/g protein) ile ortalama  $\pm$  S.H.'lar Tablo VI'da ve Şekil 11'de verilmiştir.

**Tablo VI. Kontrol, Raloksifen ve Ral + KA gruplarına ait beyin kortekslerindeki GSH düzeyleri ve ortalama  $\pm$  S.H.'ları.**

Örnek No	Kontrol Grubu (nmol/ g protein)	Raloksifen Grubu (nmol/ g protein)	Raloksifen + KA Grubu (nmol/ g protein)
1	20.09	21.50	22.60
2	12.81	22.70	30.78
3	17.71	20.18	36.17
4	13.42	18.60	19.27
5	25.54	22.27	34.86
6	28.82	31.23	30.13
<b>Ort <math>\pm</math> S.H.</b>	<b>19.731 <math>\pm</math> 2.63</b>	<b>22.746 <math>\pm</math> 1.803*</b>	<b>28.968 <math>\pm</math> 2.743**</b>

\*Raloksifen ve Ral + KA grupları arasında anlamlı bir farklılık vardır. ( $p < 0.05$ ),

\*\*Kontrol ve Ral + KA grupları arasında anlamlı bir farklılık vardır. ( $p < 0.05$ )



**Şekil 11. Kontrol, Raloksifen ve Ral+KA gruplarına ait beyin korteks dokusundaki GSH düzeylerinin (ortalama  $\pm$  S.H.) dağılımı**

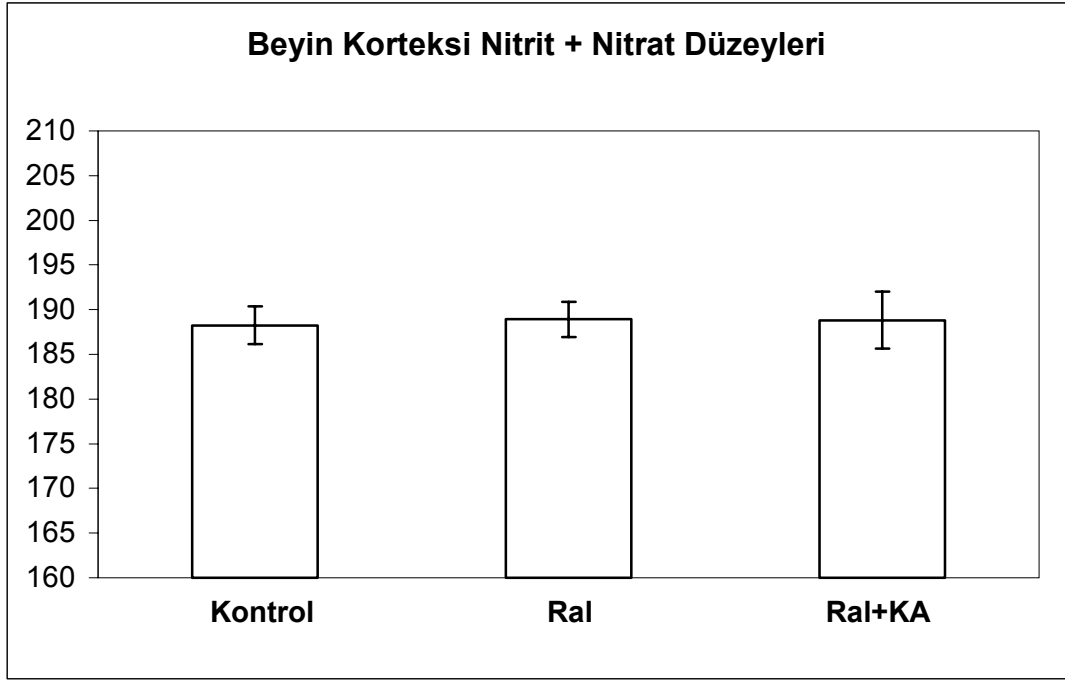
### 3.4. Beyin Korteks Doku Örneklerinde Nitrit-Nitrat Düzeyleri

Overiektomize kontrol, Raloksifen ve Raloksifen + KA gruplarına ait beyin korteks örneklerinde elde edilen nitrit, nitrat ve total nitrit-nitrat düzeyleri (nmol/mg protein) ile ortalama  $\pm$  S.H.'lar Tablo VII ve Şekil 12'de verilmiştir. Sırasıyla kontrol grubunda GSH düzeyi ve total nitrit-nitrat düzeyleri arasındaki Pearson korelasyon katsayısı  $r = -0.124$ , raloksifen grubunda  $r = -0.102$ , raloksifen + KA grubunda  $r = 0.165$  olarak bulunmuştur.

**Tablo VII. Kontrol, Raloksifen ve Ral + KA gruplarına ait beyin kortekslerindeki total nitrit-nitrat düzeyleri ve ortalama  $\pm$  S.H.'ları**

Örnek No	Kontrol Grubu (nmol/ mg protein)	Raloksifen Grubu (nmol/ mg protein)	Raloksifen + KA Grubu (nmol/ mg protein)
1	145.59	167.28	226.50
2	172.98	239.74	250.37
3	208.45	216.33	195.77
4	213.37	172.00	120.61
5	231.73	161.99	134.81
6	157.23	176.14	204.92
<b>Ort <math>\pm</math> S.H.</b>	<b>188.23 <math>\pm</math> 14.08</b>	<b>188.91 <math>\pm</math> 12.88</b>	<b>188.83 <math>\pm</math> 20.88</b>

Beyin korteks dokusunda nitrit-nitrat düzeyleri araştırıldığında üç grup arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.



**Şekil 12. Kontrol, Raloksifen ve Ral+KA gruplarına ait beyin korteks dokusundaki total nitrit+nitrat düzeylerinin (ortalama ± S.H.) dağılımı**

### **3.5. Beyin Korteks Doku Örneklerinden İzole Edilen Total RNA'ların konsantrasyonları ve A260/A280 oranları**

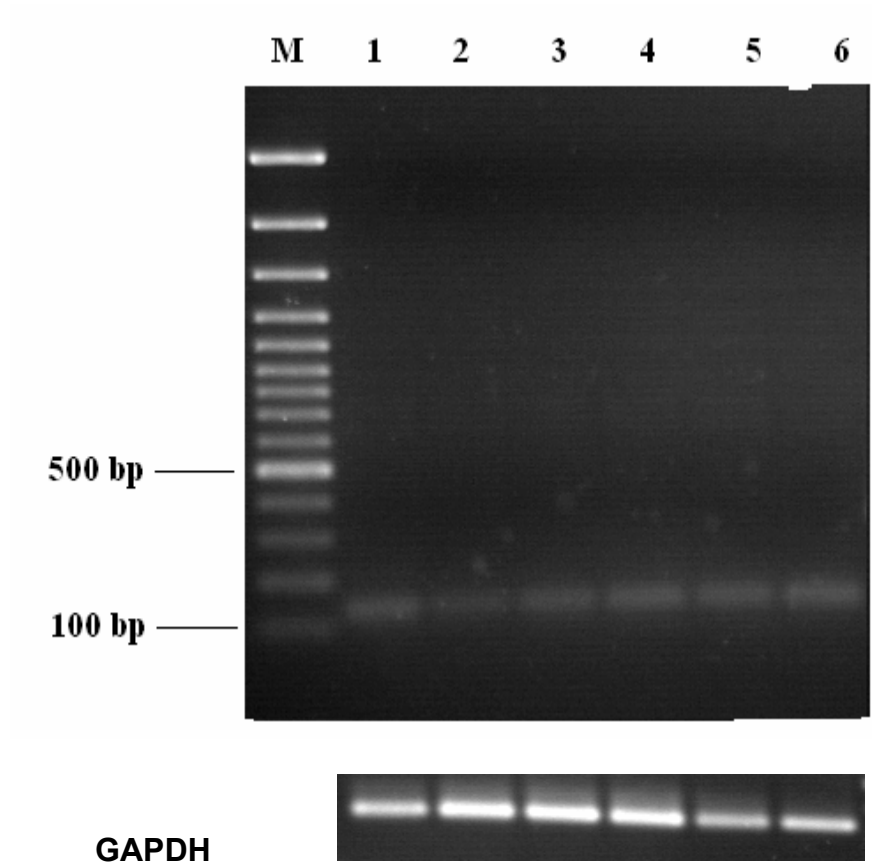
Total RNA izolasyonu yapılan beyin kortekslerindeki total RNA konsantrasyonları ve A260/A280 oranı Tablo VIII'de gösterilmiştir.

**Tablo VIII. Kontrol, Raloksifen, Ral + KA gruplarına ait beyin kortekslerindeki total RNA konsantrasyonları ve total RNA A260/A280 oranları.**

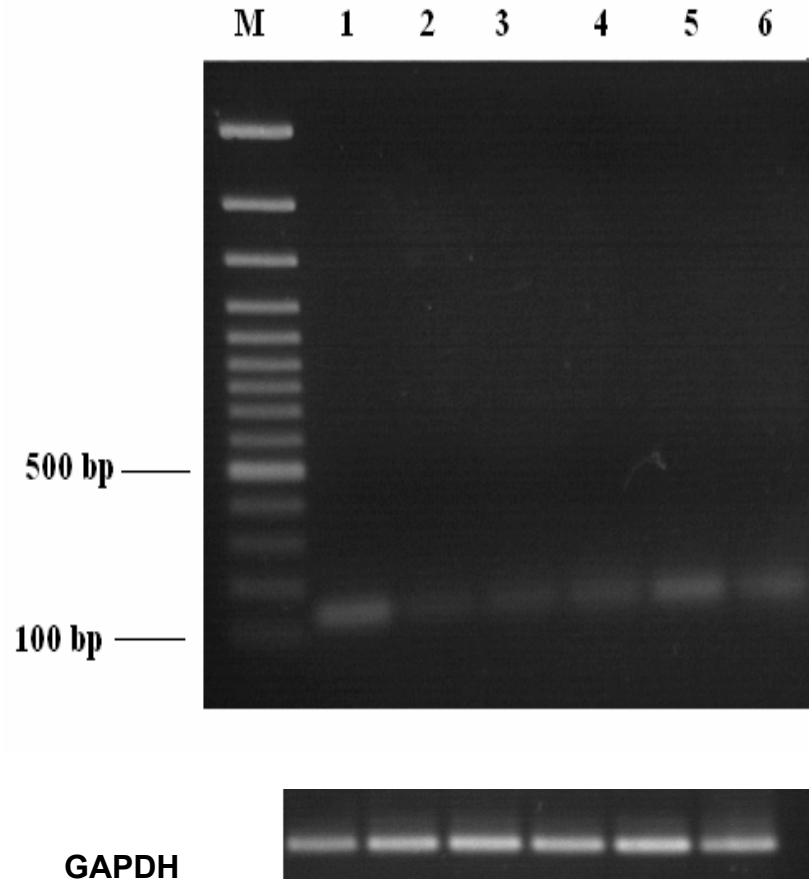
Örnek No	Kontrol		Raloksifen		Raloksifen + Kainik asit	
	Total RNA kons.	A260/A280	Total RNA kons.	A260/A280	Total RNA kons.	A260/A280
1	5,498	1,954	5,498	1,855	4,531	1,860
2	5,146	1,753	2,717	1,845	7,232	1,764
3	4,218	1,893	5,395	1,799	6,269	1,771
4	4,387	1,850	4,995	1,838	7,664	1,616
5	5,834	1,860	6,109	1,809	4,867	1,774
6	6,109	1,832	4,867	1,836	7,232	1,731

### **3.6. Beyin Korteks Doku Örneklerinde Bcl-2 Ekspresyonlarına Yönelik Görüntüler**

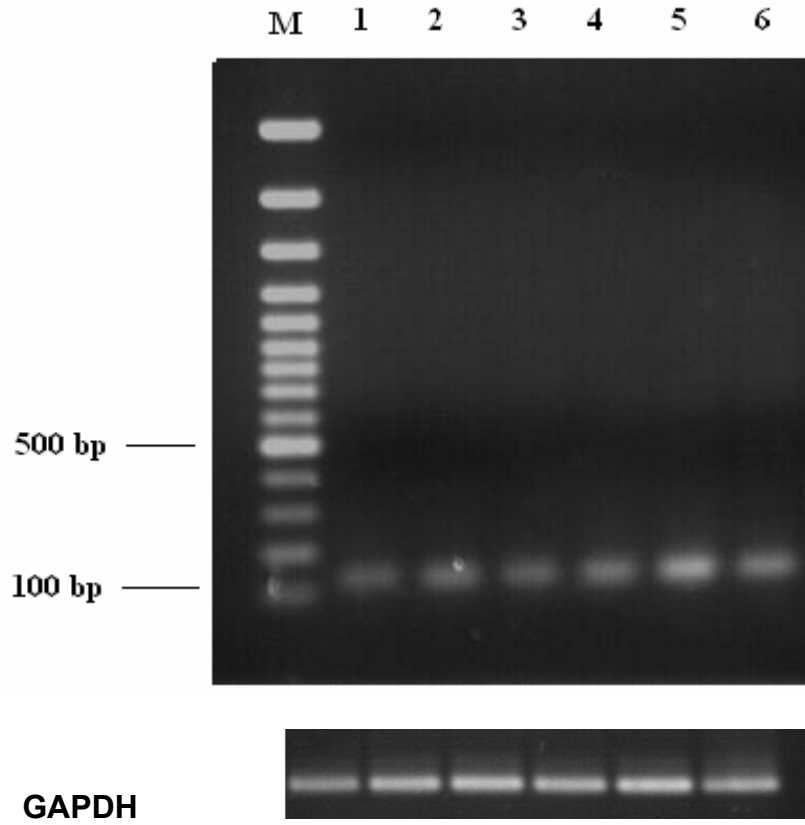
Kontrol, Raloksifen, Raloksifen + KA gruplarındaki beyin kortekslerinde Bcl-2 ekspresyonu agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. Her 3 gruba ait Bcl-2'nin kalitatif analizi Şekil 13, Şekil 14 ve Şekil 15'te sırasıyla gösterilmiştir.



**Şekil 13.** Kontrol grubuna ait beyin korteks doku örneklerinde Bcl-2 ekspresyonunun agaroz jel üzerinde kalitatif olarak gösterilmesi. M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (marker)



**Şekil 14.** Raloksifen grubuna ait beyin korteks doku örneklerinde Bcl-2 ekspresyonunun agaroz jel üzerinde kalitatif olarak gösterilmesi. M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (marker)



**Şekil 15. Ral + KA grubuna ait beyin korteks doku örneklerinde Bcl-2 ekspresyonunun agaroz jel üzerinde kalitatif olarak gösterilmesi. M: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (marker)**

### **3.7. Beyin Korteks Doku Örneklerinde Bcl-2 Ekspresyonlarının Dansitometrik Analizine Yönelik Bulgular**

Bcl-2 ekspresyonu kantitasyonu referans olarak GAPDH geninin kullanılması ile kantitatif olarak saptandı. Biocapt yardımıyla sayısal olarak belirlenen Bcl-2 bantlarının yoğunluğu GAPDH bantlarının yoğunluğuna oranlanarak sonuçlar normalize edildi. Gruplar arasındaki farklılıklar aşağıdaki Tablo IX ve Şekil 16'da gösterilmiştir.

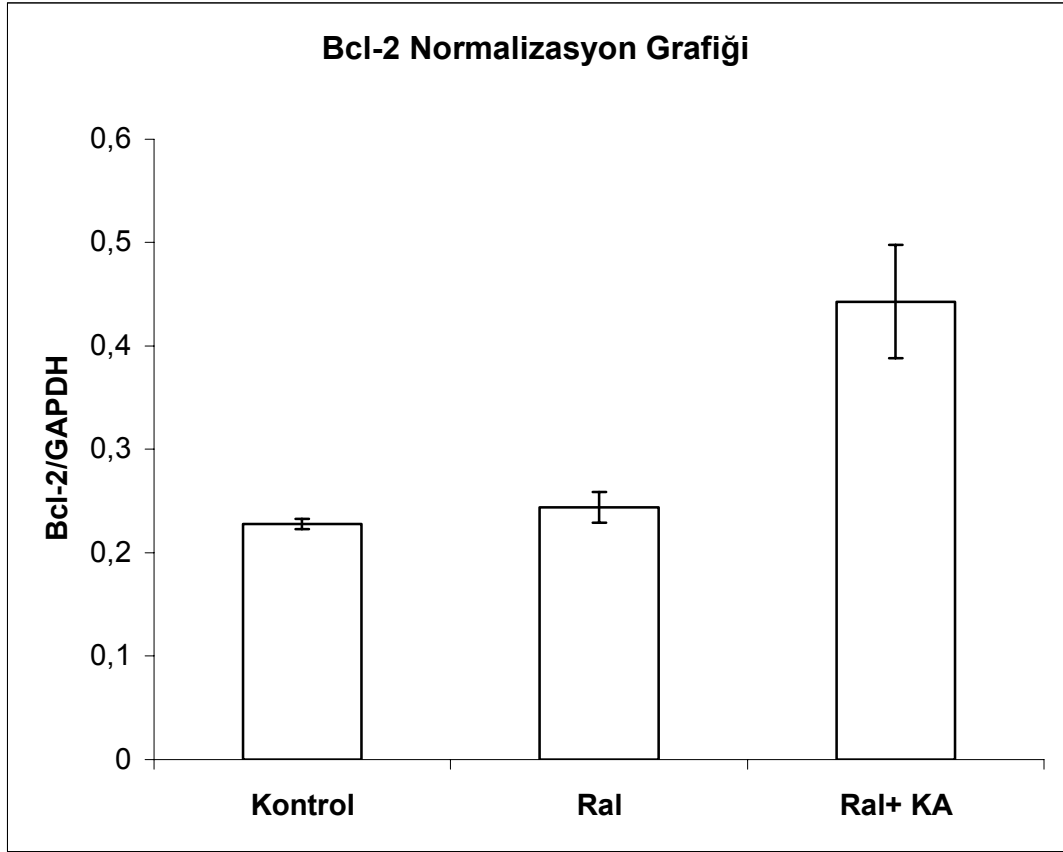


**Tablo IX. Kontrol, Raloksifen ve Ral + KA gruplarına ait beyin kortekslerindeki Bcl-2 /GAPDH oranları ve ortalama  $\pm$  S.H.'ları.**

Örnek No	Bcl-2/ GAPDH		
	Kontrol Grubu	Raloksifen Grubu	Raloksifen + KA Grubu
1	0.223	0.284	0.290
2	0.231	0.208	0.412
3	0.212	0.209	0.336
4	0.216	0.217	0.427
5	0.250	0.285	0.672
6	0.238	0.264	0.519
<b>Ort <math>\pm</math> S.H.</b>	<b>0.228 <math>\pm</math> 0.005</b>	<b>0.244 <math>\pm</math> 0.015*</b>	<b>0.443 <math>\pm</math> 0.055**</b>

\*Raloksifen ve Ral + KA grupları arasında anlamlı bir farklılık vardır. ( $p < 0.05$ ),

\*\*Kontrol ve Ral + KA grupları arasında anlamlı bir farklılık vardır. ( $p < 0.05$ )



**Şekil 16.** Kontrol, Raloksifen ve Ral+KA gruplarına ait beyin korteks doku örneklerinde Bcl-2/GAPDH ekspresyon oranları (ortalama ± S.H.) ve gruplararası dağılımı

### 3.8.Bcl-2 Ekspresyonunun GSH ve Nitrit/Nitrat Düzeyleriyle İlişkisi

Bcl-2 ekspresyonu ve GSH düzeyleri arasındaki ilişkiyi gösteren Pearson korelasyon katsayısı sırasıyla kontrol grubunda  $r = 0.661$ , raloksifen grubunda  $r = 0.369$ , raloksifen + KA grubunda  $r = 0.377$  olarak bulunmuştur. Bcl-2 ekspresyonu ve nitrit-nitrat düzeyleri arasındaki ilişkiyi gösteren Pearson korelasyon katsayısı ise kontrol grubunda  $r=0.076$ , raloksifen grubunda  $r = -0.776$ , raloksifen + KA grubunda  $r = -0.526$  olarak bulunmuştur.

## **BÖLÜM IV**

### **TARTIŞMA VE SONUÇLAR**

#### **4.1. Örnek Seçimiyle İlgili Tartışma**

Raloksifen adlı SERM, postmenapozal kadınlarda osteoporozun önlenmesinde ve tedavisinde kullanılan bir ajandır. Bu ilacın aynı zamanda beyin hücrelerini koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada beyin hücrelerinde dejenerasyon oluşturan ve limbik nöbetlere (epilepsi) sebep olan KA gibi nörotoksik bir bileşiğe karşı raloksifenin nöroprotektif etkinliğini göstermek üzere bir dizi deney yapılmıştır. Çalışmamızda 4 aylık dişi sıçanlar kullanılmış, overiektomizasyon girişimiyle sıçanlarda menapoz oluşturulmuş ve overiektomiden sonra 5 hafta beklenerek menapozun yerleşmesi sağlanmıştır (74). Böylece postmenapoz döneminde kullanım potansiyeli bulunan raloksifenin nöroprotektif etkinliğini sınamak üzere uygun bir deney modeli oluşturulmuştur.

#### **4.2. Bcl-2 Ekspresyonunun Saptanmasında Seçilen Yöntem İle İlgili Tartışma**

Bcl-2 ekspresyonu, immüno blotting, immünohistokimya ve RT-PCR gibi çeşitli yöntemlerle saptanabilir. Gen ekspresyon çalışmalarında

immunoblotting gibi antikor gerektiren yöntemlerin yorumlamasının antikorların özgül olmayışından etkilendiği bilinmektedir. Bu çalışmada, beyin korteks dokusunda Bcl-2 geninin ekspresyonunu incelemek için kompetitif RT-PCR yöntemini kullandık. Çalışmamızda kullandığımız RT-PCR yöntemi toplam deney zamanı açısından çok avantajlı olmamakla birlikte, sonuçların spesifikliğı nedeniyle kantitatif gen ekspresyonu araştırmalarında yoğun olarak tercih edilen bir yöntemdir.

M-MuLV revers transkriptaz enzimi yeni cDNA iplikciğini, belirlenmiş primerlerin bağılandığı bölgelerden sentezler. Örneğın primer olarak “Oligo-p(dT)15” kullanılmışsa poly(A)-mRNA'nın 3'– sonundan, “random primer p(dN)6” kullanılmış ise RNA kalıbı üzerindeki herhangi bir noktadan ya da sekans-spesifik bir primer ile primer-bağlanma bölgesinden başlayarak sentezler. Sentezlenen tek iplikçikli bu cDNA molekülü, daha sonra gerçekleştirilecek herhangi bir PCR amplifikasyonu için kalıp görevi görür. Çalışmamızda da kullanılan, bu yöntemde “Revers Transkriptaz- Polimeraz Zincir Reaksiyonu” adı verilmektedir. RT-PCR'da başlangıç materyali RNA'dır. Son derece hassas ve güçlü bir teknik olan bu yöntemde RNA, cDNA kopyalarına dönüştürüldükten sonra PCR ile üssel olarak çoğaltılır. Hücre içinde bulunan çeşitli spesifik gen ürünlerinin kantitatif miktarlarının belirlenmesi, bu gen ürünlerinin hücre fenotiplerindeki fonksiyonlarının belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu amaçla en çok kullanılan iki yöntem “Northern Blot Hibridizasyonu ile RNA analizi” ve “RNAaz Koruma” yöntemidir. Her iki yöntem de bir hayli hassas yöntemler olup, başlangıç materyali olarak yaklaşık 25 µg miktarında RNA gerektirmektedir. Fakat yapılan çalışmaların çoğunda az miktarda RNA içeren doku örnekleri

kullanılabilmektedir. Bu sebeple yaygın olarak kullanılan gen ekspresyonu çalışmaları bu ihtiyacı karşılayamamaktadır. Buna bağlı olarak araştırmacılar çeşitli karşılaştırma materyallerini (RNA kompetitörleri) kullanarak kantitatif sonuç veren RT-PCR yöntemleri düzenlemeye çalışmışlardır. Anlamlı kantitatif RT-PCR ölçümleri standart bir RNA kalıbına ihtiyaç duyar. Bu standart RNA, hedef RNA'nın ölçülmesinde kullanılmaktadır. RT-PCR yönteminde karşılaştırma sağlamak amacıyla genel olarak kullanılan iki tip RNA standardı mevcuttur. Bunlardan biri endojen bir gen ürünü olan ve çok yaygın olarak hemen hemen her tip hücrede üretilen  $\beta$ -aktin veya gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) dir. Diğer bir standart tipi de ekzojen olarak üretilen cRNA (komplementer RNA) dir. Bu çalışmada RNA standardı olarak endojen bir gen olan GAPDH kullanılmıştır. Ayrıca çalışmalarda beyin korteksinden izole edilen RNA'ların doğru şekilde izolasyonunun yapıldığını saptamak için A260/A280 değerlerinin 1.6-2 arasında olması beklenmektedir. Bizim çalışmamızda da yapmış olduğumuz tüm total RNA izolasyonlarında A260/A280 oranı 1.616 ile 1.860 arasında değişmektedir. Bu da çalışmada kullanılan tüm doku örneklerinden total RNA izolasyonunun doğru şekilde yapıldığını ve cDNA sentezi ve devamında Bcl-2 gen ekspresyon analizi için kullanıma uygun olduğunu göstermektedir. Beyin korteksinde Bcl-2 gen ekspresyon düzeylerinin kantitatif olarak ölçülmesi de Bcl-2 ve GAPDH PCR ürünlerinin agaroz jel üzerinde görünen yoğunluğunun birbirine oranlanması ile mümkün olmuştur (Tablo IX).

### 4.3. Beyin Korteks Doku Örneklerinde GSH Düzeyleri İle İlgili Tartışma

Çalışmamızda raloksifen uygulanmasının beyin korteksindeki GSH düzeyini arttırdığı saptanmıştır. Aynı zamanda eksitator bir ajan olan KA ve raloksifenin birlikte uygulanması da kontrol ve raloksifen grubuna göre GSH düzeyinde anlamlı bir artışa neden olmaktadır ( $p<0.05$ ). Raloksifen uygulamasını takiben beyinde artmış bulunan GSH içeriği raloksifenin potansiyel bir nöroprotektif ajan olduğunu göstermektedir. O'Neill ve arkadaşlarının (73) yaptığı bir çalışmada KA gibi beyin dokusunda dejenerasyona neden olduğu bilinen üç farklı nörotoksin ajan kullanılmış ve söz konusu çalışmada da bizim sonuçlarımıza benzer şekilde raloksifenin nörotoksik ajanlara karşı beyin hücrelerini koruduğu tespit edilmiştir. Öte yandan diğer bir çalışmada eksitotoksik bir ajan olan KA'in tek başına beyinde GSH içeriğinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (21). Ancak, Gupta ve arkadaşları (50) tarafından yapılan bir çalışmada KA uygulanan sıçanların ( $n=7$ ) beyin dokusunda GSH düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Başka bir çalışmada ise üç deney hayvanı (sıçan) grubu kullanılarak 5, 7.5 ve 10 mg/kg dozlarında KA uygulaması yapılmış ve bu hayvanların hipokampus dokularında GSH düzeylerinin anlamlı bir değişiklik göstermediği saptanmıştır (46). Söz konusu çalışmada kullanılan en yüksek KA dozu hipokampus bölgesinde GSH düzeylerini değiştirmemiştir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda kullandığımız 14 mg/kg lık KA dozu beyin korteks bölgesinde beklenildiği üzere GSH düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu durumun yorumlanmasında öne sürülecek noktalardan biri daha önceki çalışmalara benzer şekilde bizimde

yapmış olduğumuz KA uygulamasının akut bir uygulama olduğudur. Yani GSH düzeylerinde azalma şeklinde gözlenebilecek bir değişiklik ancak kronik oksidan veya nörotoksik bir uygulama ile düzenleniyor olabilir.

Gluck et al tarafından yapılan bir çalışmada 12 mg/kg dozunda KA uygulanmasının beyin korteksindeki GSH düzeylerine etkisi incelenmiş ve 4 saatlik bir süre sonunda GSH düzeyinin 18.5 nmol/mg protein olduğu saptanmıştır. Söz konusu çalışmada hiç KA uygulanmamış kontrol grubunun GSH düzeyi 27.1 nmol/mg protein olarak saptanmış ve KA uygulamasının GSH düzeylerinde %68 oranında bir azalmaya neden olabileceği gösterilmiştir (47). Yine başka bir çalışmada ise KA ile indüklenen epilepsi modelinde (status epilepticus) KA uygulamasından 8 saat sonra hem dokularda hem de mitokondride GSH/GSSG ve CoASH/CoASSG oranlarında bir düşüş gözlenmiştir. Söz konusu oranlardaki düşüşün KA'in zamana bağlı olarak meydana getirdiği oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul edildiği belirtilmektedir (63). Bizim çalışmamızda deney hayvanları KA uygulamasından 3 saat sonra dekapite edilmiş ve beyin dokuları çıkarılmıştır. İlgili literatür değerlendirildiğinde GSH düzeylerinde KA'e bağlı olarak beklenen dramatik azalmanın gerçekleşmemiş olması, GSH'un KA uygulamasını takip eden 4 ila 8 saat gibi daha uzun bir zaman aralığında gözlenebilecek bir değişiklik olmasından kaynaklanabilir.

#### **4.4. Beyin Korteks Doku Örneklerinde Nitrit-Nitrat Düzeyleri İle İlgili Tartışma**

Kontrol grubu, raloksifen ve raloksifen+KA grupları ile karşılaştırıldığında total nitrit-nitrat düzeyi açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Raloksifen ve raloksifen+KA grupları karşılaştırıldığında da total nitrat-nitrit düzeylerinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Öge ve arkadaşları (74) sıçan beyin korteksinde yaptığı çalışmada östrojen ve raloksifen tedavisinin NO düzeylerini, overiektomize grubun NO düzeylerine göre arttırdığını saptamıştır. Farelerle yapılan bir çalışmada raloksifenin eNOS'un aktivitesini stimule ettiği gözlenmiştir (48). Delen-Akçay ve arkadaşları KA ile ilgili benzer ve her grupta 7'şer sıçan bulunan bir çalışmada KA uygulanmış grubun beyin kortekslerinde total nitrit/nitrat düzeyleriyle ilgili olarak anlamlı olmayan bir artış saptamıştır (37). Yapılan çalışmalarda NO'in, KA'in etkileştiği reseptörlerden biri olan NMDA reseptörlerinin aktivitesini düşürdüğü ve böylece nöronları eksitotoksinlerin neden olduğu hasardan koruduğu gösterilmiştir (2, 31, 64).

#### **4.5. Beyin Korteks Doku Örneklerinde Bcl-2 Ekspresyonunun Dansitometrik Analizine Yönelik Tartışma**

Bcl-2 mitokondride lokalize olan bir proteindir. Bcl-2'nin mitokondrideki fonksiyonu oksidatif stres gibi sitotoksik uyarılara karşı hücre ölümünü (apoptozis) engellemek üzere mitokondrial membran potansiyel depolarizasyonunu, ATP depleksiyonunu ve lipid peroksidasyonunu



baskılamak ile ilişkilidir (112). Daha önce yapılan çalışmalar Bcl-2'nin upregülasyonunun östrojenin nöroprotektif etkilerinden sorumlu potansiyel mekanik bir yol olarak kabul edilmesine neden olmuştur. Östrojen ve Bcl-2 ilişkilerini inceleyen çalışmalara göre Bcl-2 ekspresyonu overiektomize ratlarda düşer ve bu hayvanlarda östrojen indüksiyonuna bağlı olarak Bcl-2 ekspresyonunda doza bağlı bir artış gözlenir. Serebral iskemi gibi hastalık modellerinde de benzer şekilde östrojen iskemik hasara bağlı olarak ortaya çıkan Bcl-2 ekspresyonundaki düşüşü önemli ölçüde engellemektedir. Bcl-2'nin aynı zamanda östrojen tarafından düzenlenen mitokondriyal kalsiyum toleransına da katkıları bulunmaktadır. Östrojen ve Bcl-2 ilişkisini irdeleyen son çalışmalardan birinde ise KA tarafından indüklenen glutamata bağlı eksitotoksisitede östrojen tarafından sağlanan hücresel korumanın esasını, Bcl-2 ekspresyonunun artması ve artmış bulunan Bcl-2 düzeylerine bağlı olarak kalsiyum iyonlarına karşı mitokondrial toleransın yükselmesi oluşturmaktadır (112).

Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu hücrelerde apoptozise neden olan nekrotik etkenlere karşı nöronların korunmasını sağlamaktadır (58,80). Bcl-2'nin aşırı sentezlenmesinin KA'nin neden olduğu nörotoksisiteyi azalttığı gösterilmiştir (71). Bir başka çalışmada nöronal hücrelerde glutatyonun yokluğu nedeniyle meydana gelen oksidatif stres sebebiyle oluşan apoptozisin, Bcl-2'nin aşırı sentezlenmesiyle engellendiği saptanmıştır. Buna bağlı olarak Bcl-2, ROS oluşumunu ve aktivasyonunu baskılayan bir antioksidan olarak düşünülebilir. Bcl-2'nin mitokondrial serbest radikal üretimini üzerinde de etkileri gözlenmiştir. Mitokondri oksidatif fosforilasyondan dolayı serbest radikal üretiminde önemli kaynaklardan biridir. Bcl-2'nin astrositleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin neden

olduğu hücreyel ölümden koruduğu bilinmektedir (75, 77, 106). Bu nedenle de Bcl-2'nin antioksidan etkisinden bahsedilmektedir.

Memeli hücrelerinde kalsiyum konsantrasyonu ekstraselüler kalsiyum konsantrasyonundan 10.000 kat daha azdır. Herhangi bir uyarıda hücre içi kalsiyum düzeyi artmaktadır. Mitokondrinin oldukça yüksek kalsiyum depolama kapasitesi vardır. Fakat nöronal hücrelerde kalsiyumun aşırı miktarlarda ( $>0.5 \mu\text{M}$ ) yükselmesi eksitotoksik ve iskemik beyin hasarlarında oldukça önemli rol oynamaktadır. Mitokondrial ROS oluşumunun endoplazmik retikulumdan kalsiyum serbestleşmesini arttırdığı bilinmektedir. Böylece mitokondride kalsiyum birikmesi gözlenir. Bcl-2'nin endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (1, 43). Bununla ilişkili olarak hücre çoğalması ve apoptozisin oluşmasını sağlayan kalsiyum sinyalleri engellenmiş olur. Normal koşullarda mitokondri, iyonların ve bazı küçük moleküllerin geçişine izin vermektedir. Sitokrom c gibi proteinler normalde mitokondride bulunmasına rağmen apoptozisi başlatmak için sitozole geçmektedir. Bcl-2'nin mitokondrial membran geçirgenliğindeki esas rolü; apoptotik faktörlerin sitoplazmaya geçişini kontrol altında tutmaktır. Mitokondriden salınarak hücre ölümüne neden olduğu bilinen faktörler arasında sitokrom c, AIF, ısı şok proteini 60 bulunmaktadır. Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun deneysel felci takiben oluşturulan iskemik hasarlarda nöronal kayba karşı beyini koruduğu bildirilmiştir (110). Bcl-2 bu etkisini sitokrom c'nin yer değişimini önleyerek göstermektedir. Ayrıca Bcl-2 proapoptotik proteinleri hidrofobik bağlarla bağlayarak heterodimerizasyon oluşturmakta ve hücreleri apoptozisten korumaktadır.

Östrodiolün nöronlarda Bcl-2 sentezini arttırdığı saptanmıştır. Östrojenin nöroprotektif etkisinin görüldüğü durumlarda Bcl-2'nin de sentezinin arttığı gözlenmektedir (44). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve glutamatın neden olduğu ölümden hücreleri, östrojen ve Bcl-2 birlikte korumaktadır (93). Bcl-2'nin nöronal ölümü önlediği gibi aksonal gelişme ve aksonal rejenerasyonun başlamasında da katkıları olabileceği düşünülmektedir (52).

Bcl-2'nin mitokondrilerden sitokrom c'nin salıverilmesini inhibe etmesine ek olarak oksidatif stres koşullarında bazı önemli görevleri olabileceği de öne sürülmektedir. Buna göre Bcl-2 reaktif oksijen türlerine karşı klasik bir antioksidan gibi davranabilmektedir. Bunu destekleyecek nitelikte daha önce yapılmış olan bazı çalışmalarda Bcl-2'nin adriamisin, parakuat, hidrojen peroksit, 6-OHDA ve MPTP gibi aşırı ROS üretimine neden olan prooksidanlara karşı beyin dokusunu koruyabildiği gösterilmiştir (53). Ayrıca hipotalamus ve kortikal astrosit hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada Bcl-2'nin süperoksit dismütaz, katalaz gibi antioksidanların düzey veya aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise Bcl-2'nin mitokondri membranlarını lipid peroksidasyonundan koruduğu ve mitokondri kaynaklı ROS üretimini bloke edebileceği belirtilmektedir.

Zhao ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada hipokampal nöron hücre kültürü kullanılmış ve östrojen reseptörlerinin aktivasyonu selektif agonistlerle sağlanmıştır. Östrojen reseptör agonistlerinin hipokampal nöronlardaki koruyucu etkisi eksitotoksisite deney modelinde araştırılmıştır. Bcl-2 sentezinin reseptörlerin uyarılmasıyla arttığı ve nöronların korunmasında Bcl-2 sentezinin önemli bir yere sahip olduğu bu çalışmada vurgulanmıştır (112). Bununla birlikte beyinde selektif östrojen reseptör modülatörlerinin koruyucu

etkisiyle ilgili sınırlı çalışmalar bulunmaktadır (62, 73, 111). Bizim çalışmamızda raloksifen tedavisiyle birlikte dişi sıçanlarda beyin dokusunda Bcl-2 sentezinin arttığı gözlenmektedir. Bu da raloksifenin menapoz sonrası beyinde meydana gelebilecek apoptotik olayları, Bcl-2 sentezini artırarak engelleyebileceğini düşündürmektedir. Lopez ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada dişi sıçanlara KA uygulanmıştır. Sıçanların çeşitli beyin bölgelerinde Bcl-2, Bax ve Bcl-xl düzeyleri araştırılmış ve beyin korteksinde anti-apoptotik protein olan Bcl-2 sentezinin azaldığı, proapoptotik protein olan Bax sentezinin ise beklendiği şekilde eksitotoksisteyi takiben arttığı saptanmıştır (65). Bizim çalışmamızda KA ve raloksifenin birlikte uygulanmasını takiben overiektomize sıçanlarda Bcl-2 sentezinin kontrol ve raloksifen grubuna göre anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). Diğer çalışmalarda olduğu gibi KA uygulamasının Bcl-2 sentezini azaltması beklenmiş ve yanısıra raloksifen uygulanmasıyla Bcl-2 sentezinin arttığı saptanmıştır. Bununla birlikte bölüm 3.8'de hesaplanan Bcl-2 ekspresyonu ve GSH düzeyleri arasındaki ve Bcl-2 ekspresyonu ve total nitrit-nitrat düzeyleri arasındaki ilişkiyi gösteren Pearson korelasyon katsayılarına bakıldığında bu parametrelerin korelasyon içerisinde olmadığı söylenebilir. Bu verilere dayanarak, raloksifenin nöroprotektif etki mekanizmasını oluşturan öğelerden birinin antiapoptotik bir protein olan Bcl-2'nin gen düzeyindeki ekspresyonunun indüksiyonu olduğu söylenebilir.

## ÖZET

### OVERIEKTOMİZE RATLARDA SELEKTİF ÖSTROJEN RESEPTÖR MODÜLATÖRÜ UYGULAMASININ NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Selektif östrojen reseptör modülatörleri (SERMs) farklı östrojenik ve antiöstrojenik-doku spesifik etkilere sahip bileşiklerdir ve son yıllarda postmenapozal süreçte östrojen hormon replasmanı amacıyla kullanılmaktadırlar. SERM'lerin östrojen reseptörleriyle etkileşerek doku spesifik etkiler gösteriyor olması, bu bileşiklerin östrojen hormonuna benzer nöroprotektif etkinliğinin ortaya konulmasına yönelik çalışmaları hızlandırmıştır.

Bizim çalışmamızda en iyi bilinen SERM türevlerinden raloksifenin olası nöroprotektif etkileri deneysel olarak menapoz oluşturulmuş (overiektomize) ratlar üzerinde kainik asitle (KA) indüklenen eksitotoksik beyin hasarı modeli üzerinde araştırılmıştır. Çalışmamızda Sprague-Dawley ratlar kullanılmış ve deney hayvanlarının tümü overiektomize edildikten sonra kontrol (n=6), raloksifen (n=6) ve raloksifen+KA (n=6) olmak üzere üç gruba ayrılmıştır.

Raloksifenin KA benzeri nörodejeneratif bir ajana karşı nöroprotektif etkinliğini ortaya koymak amacıyla rat beyin korteksinde total glutatyon (GSH), nitrit-nitrat düzeyleri ve Bcl-2 ekspresyonları araştırılmıştır.

Bulgularımız overiektomize ratlarda KA tarafından indüklenen beyin hasarında raloksifen uygulamasının beyin korteksinde antiapoptotik bir gen olan Bcl-2 ekspresyonunu ve antioksidan özellikteki glutatyonun miktarını anlamlı bir şekilde arttırdığını, nitrit-nitrat düzeyleri üzerinde ise belirgin bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Sonuç olarak beyin korteksinde Bcl-2 ekspresyonu ve GSH düzeylerinin yükselmesi raloksifen tedavisinin postmenapozal dönemde nöroprotektif bir ajan olarak da kullanımını destekleyecek bulgular olarak değerlendirilmiştir.

## **ABSTRACT**

### **NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF SELECTIVE ESTROGEN RECEPTOR MODULATORS (SERMs) ON OVARECTOMIZED RATS**

The selective estrogen receptor modulators (SERMs) are compounds that activate the estrogen receptors with different estrogenic and antiestrogenic tissue-specific effects. The similar effects of SERMs to estrogen encourage the efforts in the research of neuroprotective effects of SERMs.

In our study, the potential neuroprotective effects of raloxifene, known as the most popular SERM, was investigated on the brain cortex of ovariectomized rats after kainic acid(KA)-induced brain damage. The Sprague-Dawley rats were used in the experiment and divided into 3 groups after ovariectomy as follows: the control group (n=6), the raloxifene group (n=6) and the raloxifene + KA group (n=6).

To show the neuroprotective effect of raloxifene against a neurodegenerative agent, KA, expression of Bcl-2, total glutathione and nitrite-nitrate levels were investigated in the rat brain cortex.

Our results demonstrate that raloxifene treatment against KA-induced brain damage significantly increases the expression of antiapoptotic gene, Bcl-2 and the level of glutathione in the brain cortex, on the other hand there

is no significant contribution to nitrite-nitrate levels. In conclusion, the increased levels of Bcl-2 expression and glutathione in the brain cortex may support the notion of raloxifene as a neuroprotective agent and its use may be beneficial in postmenopausal term.



## YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Abeele, F.V., Skryma, R., Shuba, Y. (2002). Bcl-2-Dependent Modulation of Ca(2+) Homeostasis and Store-Operated Channels in Prostate Cancer Cells, *Cancer Cell*, 1: 169-179.
2. Aizenman, E., Brimecombe, J.C., Potthoff, W.K., Rosenberg, P.A. (1998). Why is the Role of Nitric Oxide in NMDA Receptor Function and Dysfunction so Controversial?, *Prog Brain Res*, 118: 53-71.
3. Alkayed, N.J., Murphy, S.J., Traystman, R.J., Hurn, P.D., Miller, V.,M. (2000). Neuroprotective Effects of Female Gonadal Steroids in Reproductively Senescent Female Rats, *Stroke*, 31: 161-168.
4. Bains, J.S., Shaw, C.A. (1997). Neurodegenerative Disorders in Humans: the Role of Glutathione in Oxidative-stress Mediated Neuronal Death, *Brain Res Rev*, 25: 335-358.
5. Baker, V.L., Draper, M., Paul, S., Allerheiligen, S., Glant, M., Shifren, J., Jaffe, R.B. (1998). Reproductive Endocrin and Endometrial Effects of Raloxifene Hydrochloride, a Selective Estrogen Receptor Modulator, in Women with Regular Menstruel Cycles, *J Clin Endocr Metab*, 83(1): 6-13.
6. Bartus, R.T., Baker, K.L., Heiser, A.D., Sawyer, S.D., Dean, R.L., Elliott, P.J., Straub, J.A. (1994). Postischemic Administration of AK275, a Calpain Inhibitor, Provides Substantial Protection Against Focal Ischemic Brain Damage, *J Cereb Blood Flow Metab*, 41(4): 537-544.

7. Bartus, R.T., Hayward, N.J., Elliott, P.J., Sawyer, S.D., Baker, K.L., Dean, R.L., Akimaya, A., Straub, J.A., Harbeson, S.L., Li, Z. (1994). Calpain Inhibitor AK295 Protects Neurons from Focal Brain Ischemia. Effects of Postocclusion Intra-arterial Administration, *Stroke*, 25(11): 2265-2270.
8. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A. (1990). Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endotelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide, *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(4): 1620-1624.
9. Beckman, J.S., Crow, J.P. (2003). Pathological Implications of Nitric Oxide, Superoxide and Peroxynitrite Formation, *Biochem Soc Trans*, 21: 330-334.
10. Beckman, J.S., Koppenol, W.H. (1996). Nitric Oxide, Superoxide, and Peroxynitrite: The Good, The Bad, and Ugly, *Am J Physiol*, 271(5): 1424-1437.
11. Behl, C. (2003). Estrogen can Protect Neurons: Modes of Action, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 83: 195-197.
12. Bernardi, F., Pluchino, N., Stomati, M., Pieri, M., Genazzani, A.R. (2003). CNS: Sex Steroids and SERMs, *Ann N Y Acad Sci*, 997: 378-388.
13. Biewenga, E., Cabell, L., Audesirk, T. (2005). Estrodiol and Raloxifene Protect Cultured SN4741 Neurons Against Oxidative Stress, *Neurosci Lett*, 373: 179-183.
14. Birge, S.J. (1998). Hormones and the Aging Brain, *Geriatrics*, 53: 28-30.

15. Bliss, T.V., Collingridge, G.L. (1993). A Synaptic Model of Memory: Long-term Potentiation in the Hippocampus, *Nature*, 361(6407): 31-39.
16. Bories, P.N., Bories, C. (1995). Nitrate Determination in the Biological Fluids by an Enzymatic One-step Assay with Nitrate Reductase, *Clin Chem*, 41(6): 904-907.
17. Bracamonte, M.P., Rud, K.S., Miller, V.M. (2002). Mechanism of Raloxifene-Induced Relaxation in Femoral Veins Depends on Ovarian Hormonal Status, *J Cardiovasc Pharmacol*, 39: 704-713.
18. Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., Carlquist, M. (1997). Molecular Basis of Agonism and Antagonism in the Estrogen Receptor, *Nature*, 389(6652): 753-758.
19. Calabrese, V., Bates, T.E., Stella, A.M. (2000). NO Synthase and NO-Dependent Signal Pathways in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders: The Role of Oxidant/Antioxidant Balance, *Neurochem Res*, 25(9-10): 1315-1341.
20. Cassarino, D.S., Bennett, J.P. (1999). An Evaluation of the Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: Mitochondrial Mutations and Oxidative Pathology, Protective Nuclear Responses, and Cell Death in Neurodegeneration, *Brain Res Brain Res Rev*, 29(1): 1-25.
21. Ceccon, M., Giusti, P., Facci, L., Borin, G., Imbesi, M., Floreani, M., Skaper, S.D. (2000). Intracellular Glutathione Levels Determine Cerebellar Granule Neuron Sensitivity to Excitotoxic Injury by Kainic Acid, *Brain Res*, 862: 83-89.

22. Chen, D.F., Schneider, G.E., Martinou, J.C., Tonegawa, S. (1997). Bcl-2 Promotes Regeneration of Severed Axons in Mammalian CNS, *Nature*, 385: 434-439.
23. Chiueh, C.C. (1999), Neuroprotective Properties of Nitric Oxide, *Ann N Y Acad Sci*, 890: 301-311.
24. Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M., Kriegstein, A.R. (1987). Glutamate Neurotoxicity in Cortical Cell Culture, *J Neurosci*, 7(2): 357-368.
25. Chomczynski, P. (1993). A Reagent for the Single-step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples. *Biotechniques*, 15: 532-537.
26. Ciani, E., Guidi, S., Bartesaghi, R. Contestabile, A. (2002). Nitric Oxide Regulates cGMP, Dependent cAMP-responsive Element Binding Protein Phosphorylation and Bcl-2 Expression in Cerebellar Neurons: Implication for a Survival Role of Nitric Oxide, *J Neurochem*, 82: 1282-1289.
27. Ciani, E., Virgili, M., Contestabile, A. (2002). Akt Pathway Mediates a cGMP-dependent Survival Role of Nitric Oxide in Cerebellar Granule Neurons, *J Neurochem*, 81(2): 218-228.
28. Ciriza, I., Azcoitia, I., Garcia-Segura, M. (2004). Reduced Progesterone Metabolites Protect Rat Hippocampal Neurons from Kainic Acid Excitotoxicity in vivo, *J Neuroendocrinol*, 16: 58-63.
29. Clarkson, T. (2002). Raloxifene revisited, *Ferti Steril*, 77(3): 445-447.
30. Cohen, F.J., Lu, Y. (2000), Characterization of Hot Flashes Reported by Healthy Postmenopausal Women Receiving Raloxifene or Placebo During Osteoporosis Prevention Trials, *Maturitas*, 34: 65-73.

31. Contestabile, A., Ciani, E. (2004). Role Of Nitric Oxide in the Regulation of Neuronal Proliferation, Survival and Differentiation, *Neurochem Int*, 45: 903-914.
32. Cooper, A.J., Kristal, B.S. (1997). Multiple Roles of Glutathione in the Central Nervous System, *Biol Chem*, 378(89): 793-802.
33. Coyle, J.T., Puttfarcken, P. (1993). Oxidative Stress, Glutamate, and Neurodegenerative Disorders, *Science*, 262(5134): 689-695.
34. Cyr, M., Ghribi, O., Thibault, C., Morissette, M., Landry, M., Di Paolo, T. (2001). Ovarian Steroids and Selective Estrogen Receptor Modulators Activity on Rat Brain NMDA and AMPA Receptors, *Brain Res Rev*, 37: 153-161.
35. Cztokowska, A., Ciesielska, A., Joniec, I. (2003). Influence of Estrogens on Neurodegenerative Processes, *Med Sci Monit*, 9(10): 247-256.
36. Dawson, V.L., Dawson, T.M. (1998). Nitric Oxide in Neurodegeneration, *Prog Brain Res*, 118: 215-229.
37. Delen-Akçay, Y., Yalcin, A., Yıldırım-Sozmen, E. (2005). The Effect of Melatonin on Lipid Peroxidation and Nitrite/nitrate Levels, and on Superoxide Dismutase and Catalase Activities in Kainic Acid-induced Injury, *Cell Mol Biol Lett*, 10: 321-329.
38. Delmas, P.D., Bjarnason, N.H., Mitlak, B.H., Ravoux, A.C., Shah, A.S., Huster, W.J., Draper, M., Christiansen, C. (1997). Effects of Raloxifene on Bone Mineral Density, Serum Cholesterol Concentrations, and Uterine Endometrium in Postmenopausal Women, *New Engl J Med*, 337(23): 1641-1647.

39. Diel, P. (2002). Tissue-specific Estrogenic Response and Molecular Mechanisms, *Toxicol Lett*, 127: 217-224.
40. Dringen, R. (2000). Metabolism and Functions of Glutathione in Brain, *Prog Neurobiol*, 62: 649-671.
41. Dunnett, S.B., Bjorklund, A. (1999). Prospects for New Restorative and Neuroprotective Treatments in Parkinson's Disease, *Nature*, 399(6738): 32-39.
42. Eberling, J.M., Wu, C., Tong-Turnbeaugh, R., Jagust, W.J. (2004). Estrogen- and tamoxifen-associated Effects on Brain Structure and Function, *NeuroImage*, 21: 364-371.
43. Foyouzi-Youssefi, R., Arnaudeau, S., Borner, C. (2000). Bcl-2 Decreases the Free Ca<sup>2+</sup> Concentration within the Endoplasmic Reticulum, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 5723-5728.
44. Garcia-Segura, L.M., Azcoitia, I., DonCarlos, L.L. (2001). Neuroprotection by Estradiol, *Prog Neurobiol*, 63: 29-60.
45. Gerlach, M., Ben-Shachar, D., Riederer, P., Youdim, M.B. (1994). Altered Brain Metabolism of Iron as a Cause of Neurodegenerative Diseases?, *J Neurochem*, 63(3): 793-807.
46. Gilberti, E.A., Trombetta, L.D. (2000). The Relationship Between Stress Protein Induction and the Oxidative Defense System in the Rat Hippocampus Following Kainic Acid Administration, *Toxicol Lett*, 116: 17-26.
47. Gluck, M.R., Jayatilleke, E., Shaw, S., Rowan, A.J., Haroutunian, V. (2000). CNS Oxidative Stress Associated with the Kainic acid Rodent Model of Experimental Epilepsy, *Epilepsy Res*, 39: 63-71.

48. Grandbois, M., Morissette, M., Callier, S., Di Paolo, T. (2000). Ovarian steroids and raloxifene prevent MPTP-induced dopamine depletion in mice, *NeuroReport*, 11: 343-346.
49. Griffiths, C., Garthwaite, J. (2001). The Shaping of Nitric Oxide Signals by a Cellular Sink, *J Physiol*, 536(3): 855-862.
50. Gupta, Y.K., Brial, S. (2006). Protective Effect of Vineatrol Against Kainic Acid Induced Seizures, Oxidative Stress and on the Expression of Heat Shock Proteins in Rats, *Eur Neuropsychopharmacol*, 16: 85-91.
51. Ho, Y.S., Magnenat, J.L., Bronson, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugwara, M., Funk, C.D. (1997). Mice Deficient in Cellular Glutathione Peroxidase Develop Normally and Show No Increased Sensitivity to Hyperoxia, *J Biol Chem*, 272(26): 16644-16651.
52. Holm, K., Isacson, O. (1999). Factors Intrinsic to the Neuron can Induce and Maintain Its Ability to Promote Axonal Outgrowth: A Role for Bcl-2?, *Trend Neurosci*, 22: 269-273.
53. Howard, S., Bottino, C., Brooke, S., Cheng, E., Giffard, R.G., Sapolsky, R. (2002). Neuroprotective Effects of bcl-2 Overexpression in Hippocampal Cultures: Interactions with Pathways of Oxidative Damage, *J Neurochem*, 83: 914-93.
54. Huang, P.L. (2004). Nitric Oxide and Cerebral Ischemic Preconditioning, *Cell Calcium*, 36: 323-329.
55. Ignarro, L.J., Fukuto, J.M., Griscavage, J.M., Rogers, N.E., Byrns, R.E. (1993). Oxidation of Nitric Oxide in Aqueous Solution to Nitrite but not Nitrate: Comparison with the Enzymatically Formed Nitric Oxide from L-Arginine, *Proc Natl Acad Sci*, 90: 8103-8107.

56. Imlay, J.A., Linn, S. (1988). DNA Damage and Oxygen Radical Toxicity, *Science*, 240(4857): 1302-1309.
57. Jarskog, L.F., Gilmore, J.H., Selinger, E.S., Lieberman, J.A. (2000). Cortical Bcl-2 Protein Expression and Apoptotic Regulation in Schizophrenia, *Biol Psychiatry*, 48: 641-650.
58. Jia, W., Wang, Y., Qiang, D., Tufaro, F., Remington, R., Cynader, M. (1996). A bcl-2 Expressing Viral Vector Protects Cortical Neurons from Excitotoxicity Even When Administered Several Hours After the Toxic Insult, *Brain Res Mol Brain Res*, 42: 350-358.
59. Kato, K., Puttfarcken, P.S., Lyons, W.E., Coyle, J.T. (1991). Developmental Time Course and Ionic Dependence of Kainate-Mediated Toxicity in Rat Cerebellar Granule Cell Cultures, *J Pharmacol Exp Ther*, 256(1): 402-411.
60. Keilhoff, G., Fansa, H., Wolf, G. (2002). Neuronal nitric oxide synthase is the dominant nitric oxide supplier for the survival of dorsal root ganglia after peripheral nerve axotomy, *J Chem Neuroanat*, 24: 181-187.
61. Kondo, Y., Suzuki, K., Sakouma, Y. (1997). Estrogen Alleviates Cognitive Dysfunction Following Transient Brain Ischemia in Ovariectomized Gerbils, *Neurosci Lett*, 238(1-2): 45-8.
62. Krishnan, M., Dhandapani-Darrell, W.B. (2002). Protective Effects of Estrogen and Selective Estrogen Receptor Modulators in the Brain, *Biol Reprod*, 67: 1379-1385.
63. Liang, L., Patel, M. (2006). Seizure-induced Changes in Mitochondrial Redox Status, *Free Rad Biol & Med*, 40(2): 316-322.



64. Lipton, S.A., Choi, Y.B., Sucher, N.J., Chen, H.S. (1998). Neuroprotective versus neurodestructive effects of NO-related species, *Prog Brain Res Biofactors*, 8: 33-40.
65. Lopez, E., Pozas, E., Rivera, R., Ferrer, I. (1999). Bcl-2, Bax and Bcl-xl Expression Following Kainic Acid Administration at Convulsant Doses in the Rat, *Neuroscience*, 91(4): 1461-1470.
66. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent, *J Biol Chem*, 193: 265-375.
67. Luine, V.N. (1985). Estradiol Increases Choline Acetyltransferase Activity in Specific Basal Forebrain Nuclei and Projection Areas of Female Rats, *Exp Neurol*, 89: 484-490.
68. Marini, H., Altavilla, D., Bellomo, M., Adamo, E.B., Marini, R., Laureanti, F., Bonaccorso, M.C., Seminara, P., Passaniti, M., Minutoli, L., Bitto, A., Calapai, G., Squadrito, F. (2004). Modulation of IL-1 Beta Gene Expression by Lipid Peroxidation Inhibition After Kainic Acid-Induced Rat Brain Injury, *Exp Neurol*, 188: 178-186.
69. arzinzig, M., Nussler, A.K., Stadler, J., Marzinzig, E., Barthlen, W., Nussler, N.C., Beger, H.G., Morris, S.M., Brückner, U.B. (1997). Improved Methods to Measure End Products of Nitric Oxide in Biological Fluids: Nitrite, Nitrate, and S-Nitrosothiols, *Nitric oxide*, 1(2): 177-189.
70. McDonnell, D.P. (1999). The Molecular Pharmacology of SERMs, *TEM*, 10(8): 301-311.

71. McLaughlin, J., Roozendaal, B., Gupta, A., Ajilore, O., Dumas, T., Hsieh, J., Ho, D., Lawrence, M., McGaugh, J., Sapolsky, R. (2000). Spraying of Neuronal Function Post-Seizure with Gene Therapy, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(23): 12804-12809.
72. McNeill, A.M., Kim, N., Duckles, S.P., Krause, D.N., Kontos, H.A. (1999). Chronic Estrogen Treatment Increases Levels of Endothelial Nitric Oxide Synthase Protein in Rat Cerebral Microvessels, *Stroke*, 30: 2186-2190.
73. O'Neill, K., Chen, S., Brinton, R.D. (2004). Impact of the Selective Estrogen Receptor Modulator, Raloxifene, on Neuronal Survival and Outgrowth Following Toxic Insults Associated With Aging and Alzheimer's Disease, *Exp Neurol*, 185: 63-80.
74. Oge, A., Sezer, E.D., Ozgonul, M., Bayraktar, F., Sozmen, E.Y. (2003). The Effects of Estrogen and Raloxifene Treatment on the Antioxidant Enzymes and Nitrite-Nitrate Levels in Brain Cortex of Ovariectomized Rats, *Neurosci Lett*, 338: 217-220.
75. Ouyang, Y., Giffard, R.G. (2004). Cellular Neuroprotective Mechanisms in Cerebral Ischemia: Bcl-2 Family Proteins and Protection of Mitochondrial Function, *Cell Calcium*, 36: 303-311.
76. Paganini-Hill, A., Henderson, V.W. (1996). Estrogen Replacement Therapy and Risk of Alzheimer Disease, *Arch Intern Med*, 156(19): 2213-2217.
77. Papadopoulos, M.C., Koumenis, I.L., Xu, L., Giffard, R.G. (1998). Potentiation of Murine Astrocyte Antioxidant Defence by Bcl-2:

- Protection in Part Reflects Elevated Glutathione Levels, *Eur J Neurosci*, 10: 1252-1260.
78. Park, D.S., Obeidat, A., Giovanni, A., Greene, L.A. (2000). Cell Cycle Regulators in Neuronal Death Evoked by Excitotoxic Stress: Implications for Neurodegeneration and Its Treatment, *Neurobiol Aging*, 21: 771-781.
79. Pfeiffer, S., Gorren, A.C.F., Schmidt, K., Werner, E.R., Hansert, B., Bohle, D.S., Mayer, B. (1997). Metabolic Fate of Peroxynitrite in Aqueous Solutions, *J Biol Chem*, 272: 3465-3470.
80. Phillips, R.G., Lawrence, M.S., Ho, D.Y., Sapolsky, R.M. (2000). Limitations in the Neuroprotective Potential of Gene Therapy with Bcl-2, *Brain Res*, 859: 202-206.
81. Pileblad, E., Magnusson, T. (1992). Increase in Rat Brain Glutathione Following Intracerebroventricular Administration of Gamma-Glutamylcysteine, *Biochem Pharmacol*, 44(5): 895-903.
82. Poot, M., Teubert, H., Rabinovitch, P.S., Kavanagh, T.J. (1995). De novo Synthesis of Glutathione is Required for Both Entry into and Progression Through the Cell Cycle, *J Cell Physiol*, 163(3): 555-560.
83. Porter, N.A. (1984). Chemistry of Lipid Peroxidation, *Method Enzymol*, 105: 273-282.
84. Rahimian, R., Dobe, G.P., Toma, W., Dos Santos, N., McManus, B.M., van Bremen, C. (2002). Raloxifene Enhances Nitric Oxide Release in Rat Aorta via Increasing Endothelial Nitric Oxide mRNA Expression, *Eur J Pharmacol*, 434: 141-149.

85. Satou, T., Cummings, B.J., Cotman, C.W. (1995). Immunoreactivity for Bcl-2 Protein within Neurons in the Alzheimer's Disease Brain Increases with Disease Severity, *Brain Res*, 697: 35-43.
86. Sekura, R., Meister, A. (1977). gamma-Glutamylcysteine Synthetase. Further Purification, "half of the sites" Reactivity, Subunits, and Specificity, *J Biol Chem*, 252 (89): 2599-2605.
87. Seyfried, J., Soldner, F., Schulz, J.B., Klockgether, T., Kovar, K.A., Wullner, U. (1999). Differential Effects of L-Butionine Sulfoximine and Ethacrynic Acid on Glutathione Levels and Mitochondrial Function in PC12 Cells, *Neurosci Lett*, 264(1-3): 1-4.
88. Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 Family Proteins Regulate the Release of Apoptogenic Cytochrome c by the Mitochondrial Channel VDAC, *Nature*, 483-486.
89. Shumaker, S.A., Legault, C., Kuller, L., Rapp, S.R., Thal, L., Lane, D.S., Fillit, H., Stefanick, M.L., Hendrix, S.L., Lewis, C.E., Masaki, K., Coker, L.H. (2004). Conjugated Equine Estrogens and Incidence of Probable Dementia and Mild Cognitive Impairment in Postmenopausal Women, *JAMA*, 291(24): 2947-2958.
90. Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Jenner, P., Marsden, C.D. (1994). Glutathione-related Enzymes in Brain in Parkinson's Disease, *Ann Neurol*, 36(3): 356-361.
91. Siesjo, B.K., Agardh, C.D., Bengtsson, F. (1989). Free Radicals and Brain Damage, *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1(3): 165-211.
92. Simoncini, T., Genazzani, A.R., Liao, J.K., (2002). Non-genomic Mechanisms Of Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation by the

- Selective Estrogen Receptor Modulator Raloxifene, *Circulation*, 105: 1368-1373.
93. Singer, C.A., Rogers, K.L., Dorsa, D.M. (1998). Modulation of Bcl-2 Expression: a Potential Component of Estrogen Protection in NT2 Neurons, *Neuroreport*, 9: 2565-2568.
94. Singh, S.P., Wishnok, J.S., Keshive, M., Deen, W.M., Tannenbaum, S.R. (1996). The Chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione System, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(25): 14428-14433.
95. Sofic, E., Lange, K.W., Jellinger, K., Riederer, P. (1992). Reduced and Oxidized Glutathione in the Substantia Nigra of Patients with Parkinson's Disease, *Neurosci Lett*, 142(2): 128-130.
96. Sperk, G. (1994). Kainic Acid Seizures in the Rat, *Prog Neurobiol*, 42(1): 1-32.
97. Stein, D.G. (2001). Brain Damage, Sex Hormones and Recovery: A New Role For Progesterone and Estrogen?, *Trends Neurosci*, 24: 386-391.
98. Tang, M.X., Jacobs, D., Stern, Y., Marder, K., Schofield, P., Gurland, B., Andrews, H., Mayeux, R. (1996). Effect of Estrogen During Menopause on Risk and Age Onset of Alzheimer's Disease, *Lancet*, 348(9025): 429-432.
99. Thippeswamy, T., Jain, R.K., Mumtaz, N., Morris, R. (2001). Inhibition of Neuronal Nitric Oxide Synthase Results in Neurodegenerative Changes in the Axotomised Dorsal Root Ganglion Neurons: Evidence for A Neuroprotective Role of Nitric Oxide *in vivo*, *Neurosci Res*, 40: 37-40.

100. Townsend, D.M., Tew, K.D., Tapiero, H. (2003). The Importance of Glutathione in Human Disease, *Biomed Pharmacother*, 57: 145-155.
101. Vatassery, G.T., SantaCruz, K.S., DeMaster, E.G., Quach, H.T., Smith, W.E. (2004). Oxidative Stress and Inhibition of Oxidative Phosphorylation Induced by Peroxynitrite and Nitrite in Rat Brain Subcellular Fractions, *Neurochem Int*, 45: 963-970.
102. Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Strada, O., Boissiere, F., Hibner, U. (1997). Expression of Bcl-2 in Adult Human Brain Regions With Special Reference to Neurodegenerative Disorders, *J Neurochem*, 69: 223-231.
103. Wink, D.A., Darbyshire, J.F., Nims, R.W., Saavedra, J.E., Ford, P.C. (1993). Reactions of the Bioregulatory Agent Nitric Oxide in the Oxygenated Aqueous Media: Determination of the Kinetics for Oxidation and Nitrosation by Intermediates Generated in the NO/Oxygen Reaction, *Chem Res Toxicol*, 6: 23-27.
104. Winterbourn, C.C., Metodiewa, D. (1994). The Reaction of Superoxide With Reduced Glutathione, *Arch Biochem Biophys*, 314(2): 284-290.
105. Wullner, U., Seyfried, J., Groscurth, P., Beinroth, S., Winter, S., Gleichmann, M., Heneka, M., Loschmann, P., Schulz, J.B., Weller, M., Klockgether, T. (1999). Glutathione Depletion and Neuronal Cell Death: The Role of Reactive Oxygen Intermediates and Mitochondrial Function, *Brain Res*, 826(1): 53-62.

106. Xu, L., Koumenis, I.L., Tilly, J.L., Giffard, R.G. (1999). Overexpression of bcl-xl Protects Astrocytes from Glucose Deprivation and is Associated With Higher Glutathione, Ferritin, and Iron Levels, *Anesthesiology*, 91: 1036-1046.
107. Yalcin, A. (2004). Quantification of Thioredoxin mRNA Expression in the Rat Hippocampus by real-time PCR Following Oxidative Stress, *Acta Biochim Pol*, 51(4): 1059-1065.
108. Yang, N.N., Bryant, H.U., Hardikar, S., Sato, M., Galvin, R.J.S., Glasebrook, A.L., Termine, J.D. (1996). Estrogen and Raloxifene Stimulate Transforming Growth Factor- $\beta$ 3 Gene Expression in Rat Bone: A Potential Mechanism for Estrogen- Or Raloxifene-Mediated Bone Maintenance, *Endocrinology*, 137(5): 2075-2084.
109. Zandi, P.P., Carlson, M.C., Plassman, B.L., Welsh-Bohmer, K.A., Mayer, L.S., Steffens, D.C., Breitner, J.C. (2002). Hormone Replacement Therapy and Incidence of Alzheimer Disease in Older Women: the Cache County Study, *JAMA*, 288(17): 2123-2129.
110. Zhao, H., Yenari, M.A., Cheng, D., Sapolsky, R.M., Steinberg, G.K. (2003). Bcl-2 Overexpression Protects Against Neuron Loss Within the Ischemic Margin Following Experimental Stroke and Inhibits Cytochrome c Translocation and Caspase-3 Activity, *J Neurochem*, 85: 1026-1036.
111. Zhao, L., O'Neill, K., Brinton, R.D. (2005). Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) for the Brain: Current Status and Remaining Challenges for Developing NeuroSERMs, *Brain Res Rev*, 49(3): 472-493.

112. Zhao, L., Wu, T., Brinton, R.D. (2004). Estrogen Receptor Subtypes Alpha and Beta Contribute to Neuroprotection and Increased Bcl-2 Expression in Primary Hippocampal Neurons, *Brain Res*, 1010: 22-34.
113. Zhong, L.T., Sarafian, T., Kane, D.J., Charles, A.C., Mah, S.P., Edwards, R.H (1993). Bcl-2 Inhibits Death of Central Neural Cells Induced by Multiple Agents, *Proc Natl Acad Sci*, 90: 4533-4537.
114. Zhou, W., Koldzic-Zivanovic, N., Clarke, C.H., de Beun, R., Wassermann, K., Bury, P.S., Cunningham, K.A., Thomas, M.L. (2002). Selective Estrogen Receptor Modulator Effects in the Rat Brain, *Neuroendocrinology*, 75(1): 24-33.



## **ÖZGEÇMİŞ**

1980 yılında Bursa'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi tamamladıktan sonra 1998 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ne girdim. 2002 yılında mezun oldum. 2003 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans çalışmalarına başladım. Aynı yıl Araştırma Görevlisi olarak aynı bölüme atandım.