

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyokimya Anabilim Dalı
Danışman:
Prof.Dr. Pernur ÖNER

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

**EKSOJEN MELATONİN VERİLMİŞ POSTNATAL
GELİŞEN SIÇANLARDA SİNAPTOZOMAL ATPaz VE
ASETİLKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNDE YAŞLA
İLİŞKİLİ DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

M.Sc. Kim. Hikmet KOÇAK
(Doktora Tezi)

İstanbul-2000

98994

Bilimsel deneyimleri ve bilgileriyle doktora başladığım ilk günden itibaren yetiştirilmemde emeği geçen, başta doktora danışman hocam Sayın Prof.Dr. Pernur Öner'e, Biyokimya Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof.Dr. Müjdat Uysal'a, tezimin yazımı aşamasında değerli önerileri için Sayın Prof.Dr. Figen Gürdöl'e, taslakların okunmasındaki ilgi ve önerileri için Sayın Prof.Dr. Necla Koçak Toker'e, gerek eğitimim gerekse tez aşamamda destek ve ilgilerini esirgemeyen tüm değerli hocalarım ve sevgili arkadaşlarıma; ayrıca tezimin istatistiksel çalışma-larında büyük yardımını gördüğüm Ph.D. Nurten Turan'a ve her zaman bana destek veren aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu'na desteklenmiştir.

Proje No: T-329/190397

İÇİNDEKİLER

Kısaltmalar

Giriş 1

Genel Bilgiler 7

Materyal 40

Metod 47

Bulgular 54

Tartışma 67

Özet 76

Summary 78

Kaynaklar 80

KISALTMALAR

6-HMLT	————	6- Hidroksimelatonin
a.a	————	amino asid
ACh	————	Asetilkolin
AChE	————	Asetilkolinesteraz
FE	————	Fosfatidiletanolamin
FK	————	Fosfatidilkolin
FS	————	Fosfatidilserin
HIOMT	————	Hidroksiindol-O-metiltransferaz
i.p.	————	intraperitoneal
MLT	————	Melatonin
MSS	————	Merkezi Sinir Sistemi
NAT	————	N-asetiltransferaz
SA	————	Sialik asid
SKN	————	Suprakiazmatik nukleus
SPM	————	Sinaptozomal plazma membranı
ÜSG	————	Üst servikal gangliyon

GİRİŞ VE AMAÇ

*'Artritlerimle yaşayabilirim,
Dişlerimin takma olması sorun değil,
Yakın ve uzak gözlüklerimle görebilirim,
Ama, hafızamı özleyeceğimden eminim'*

Yaşlılık, bir organizmanın canlılığını ve fonksiyonunu olumsuz etkileyen, fakat en önemlisi zamanın akışı ile mortalite oranının arttığı, adım adım ilerleyen olgunluk sonrası gerilemedir. Çok ileri yaşlarda bile canlılığını koruyabilen postmitotik özellikli beyin (kalp ve çizgili kasla birlikte) nöronları memeli vücudunun en yaşlı kısmıdır. Nöronun uzun yaşam süresine sahip olmasının en önemli avantajı beynin bellek ve diğer öğrenilmiş fonksiyonları canlının yaşamı boyunca sürdürebilmesi iken, dezavantajı ise barsak veya deri hücreleri gibi yenilenme özelliğinin olmamasıdır⁽⁴⁴⁾. Merkezi sinir sistemin (MSS)'de yaşlanmaya yol açan hiçbir spesifik faktör belirlenememiştir⁽²⁸⁾. Beyin yaşlanması nöral iletimin enzimatik, depolanım ve reseptör mekanizmalarındaki değişiklikler ve/veya nöronal fonksiyonda bazen kayıpla kendini gösteren ilerleyici bir azalma olarak tarif edilmektedir⁽¹³⁹⁾. Bu değişiklikler yaşla sıkı ilişkili çeşitli fizyolojik bozukluklar ve nöro-psikiyatrik hastalıklara karşı beynin daha kolay zarar görmesine yol açar⁽¹¹⁵⁾. Yaşlanma olayı tüm beyin bölgelerini eşit olarak etkilemez ve belirli bir beyin bölgesinde farklı tiplerde sinir hücresi yaşa bağımlı belirgin farklılıklar gösterebilir. Örneğin, serebral korteks beyin

sapından daha çok etkilenir ve beyin sapında bazı çekirdekler yaşlanma olayından etkilenirken diğerleri belirgin olarak dirençli kalır⁽²⁵⁾. Beyin yaşlanmasına yol açan mekanizmalar; glukoz kullanımı, oksijen harcanımı ve kan akımı azalması ile kendini gösteren beynin oksidatif enerji metabolizmasındaki değişikliklerdir^(9,95). Bu değişiklikler ile birlikte oksidatif metabolizmada rol alan bazı enzimlerde de azalma olur⁽⁹⁶⁾. İn vivo nöronal aktivasyon ile serebral oksidatif metabolizma arasında bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar vardır^(95,102,163,193). Kısa bipolar atımlarla serebral korteksin doğrudan uyarılması, kortikal nöronların bölgesel olarak aktiflenmesine ve ekstrasellüler K^+ düzeylerinin artmasına yol açar. Bunu mitokondrideki metabolik aktivitenin geçici artışı takip eder^(95,102). Bu geçici metabolik yanıtın hem başlamasının hem de bitişinin 28 aylık yaşlı Fischer-344 sıçanlarda 3 aylık genç sıçanlara kıyasla daha yavaş olduğu saptanmıştır^(95,193). Bu yanıtın başlama hızının Na^+, K^+ -ATPaz aktivasyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir^(95,163). Bu yüzden yaşlı sıçanlarda nöronal aktivasyona karşı geçici oksidatif metabolik yanıtın geç başlamasının yaşlılıkta azalmış Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesi yüzünden olabileceği ileri sürülmüştür^(95,193). Ancak bu varsayımı doğrulayacak yeterli kanıtlar elde edilememiştir. Dinlenme durumunda beynin %50'lere kadar olan oksidatif enerji metabolizmasının, K^+ ve Na^+ sızıntılarına karşı koyan Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesi için harcandığı düşünülmüştür. Aktif beyinde enzim aktivitesinin enerji sarfıyatı daha fazla artar⁽⁹⁵⁾. Bu yüzden yaşlanmada beyin metabolizmasındaki kusurların Na^+, K^+ -ATPaz'ın özelliklerindeki değişiklikler ile ilişkili olup olmadığının belirlenmesi önemli olabilir.

Spesifik biyolojik temeli hala aydınlatılamamış olan yaşlanma olaylarının tamamen anlaşılmasının moleküler düzeyde olabileceği konusunda genel bir görüş birliği vardır⁽⁹²⁾. Fizyolojik olarak aktif hücre membranları, organizmanın homeostazisinin korunmasında büyük önem taşırlar ve bu yüzden organizmanın yaşlanması ile bu membranlarda olabilecek değişikliklerin belirlenmesi önemlidir. Membran bütünlüğü hücresel homeostazisin temel ön koşuludur. Membranın yapısal bütünlüğünün korunmasında, öncelikle membranın çift

tabakasını oluşturan fosfolipid molekülleri ve membranın integral proteinleri olan membrana-bağılı enzimler önem taşır.

Nöronal eksitabilite büyük ölçüde membrana-bağılı transport enzimlerinden olan Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesine bağlıdır. Neonatal maturasyon sırasında gelişmekte olan sıçan beyinlerinde dendritlerin oluşumu ve elektriksel aktivitede artışla birlikte Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesinin arttığı gösterilmiş olup enzim aktivitesindeki bu artışın sinaptik aktivite gelişimi ile birlikte olduğu düşünülmüştür⁽²¹⁰⁾. Ayrıca sıçan beyinde gelişim sırasında beyin iyonik bileşiminde belirgin bir değişikliğin ve elektriksel aktivite başlangıcının eşlik ettiği 10-15 kat Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesi artışı olduğu bildirilmiştir⁽¹⁷⁴⁾. Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesinin, nöronal fonksiyonların yavaşladığı yaşlanma durumundaki değişikliklerine ait literatür bilgileri tutarlı değildir. Bazıları beyin Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesinin yaşa bağlı olarak azaldığını^(11,21,40), bazıları arttığını^(173,174,202) bildirmişlerdir. Bir grup araştırmacı da beyin Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesinde yaşlanmaya bağlı değişiklik olduğunu kabul etmemektedir⁽⁹⁰⁾.

Kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) birçok hücresel fonksiyonda önemli rol oynar. Ca^{2+} , presinaptik nörotransmitter salgılanmasının kontrolü ve membran eksitabilitesinin düzenlenmesi gibi çeşitli nöronal sinyal iletimi olaylarında rol alır ve ayrıca ikinci ve üçüncü haberci olarak doğrudan görev yapar. Sinir hücresinin uyarılabilirliği ve yaşamı için en önemli faktör olan düşük sitozolik kalsiyum düzeylerinin korunması, sinaptozomlardan kalsiyumun membrana-bağılı Ca^{2+} -ATPaz tarafından transportu ile olur. Sinir hücrelerinde Ca^{2+} homeostazisinin düzenlenmesi hücre-hücre haberleşmesinde anahtar rol oynar. Çeşitli çalışmalar, nöronal fonksiyonda yaşa bağımlı kusurların altında bozulmuş kalsiyum metabolizmasının yattığını düşündürmüştür. Sıçanlarda yaşın ilerlemesiyle birlikte beyin Ca^{2+} içeriği ve beyin mikrozomal Ca^{2+} -ATPaz aktivitesinin arttığını bildiren çalışmada, yaşlanma ile beyin mikrozomlarında Ca^{2+} transport sisteminin bozulabileceği düşünülmüştür⁽⁶⁵⁾. Buna karşılık bir başka araştırmacı grubu da Fischer-344 sıçan beyinlerinden elde edilen sinaptozomal plazma membran (SPM)'lerinde Ca^{2+} -ATPaz ve Ca^{2+} -bağımlı transport

aktivitesinin yaşı grupta gençlere göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir^(141,214). Beyin yaşlanması ve nörodejeneratif hastalıklarla ilgili kalsiyum hipotezi, sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun hücrel homeostazisini sağlayan mekanizmaların, yaşlanmada anahtar bir rol oynadığını ileri sürmektedir⁽¹⁵⁾. Bu hipotez, kalsiyum homeostazisindeki sürekli değişikliklerin beyin yaşlanmasıyla ilişkili nöropatolojik bozukluklar ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklar için son ortak yol olduğunu kabul etmektedir⁽¹⁵⁾. Yaşlanma ile nöronal Ca^{2+} homeostazisindeki değişikliklerin yaşla ilişkili kavramsal fonksiyon bozukluklarında rolü olabileceğinden, yaşlılıkta beyindeki Ca^{2+} metabolizması konusundaki çalışmalar büyük önem taşıyacaktır.

Çeşitli çalışmalarla beynin bellek fonksiyonu ve kolinerjik mekanizmaları arasında da önemli bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Korteksin ve hipokampusun kolinerjik innervasyonunun yaşlanma ile bozulup bozulmadığı ya da ne dereceye kadar bozulduğu açık olmamasına rağmen, Asetilkolin (ACh)'in nöronal sentezi ve salgılanımında, kolinerjik sinirlerin kolin tutulumunda ve ACh'e karşı postsinaptik yanıtta yaşla ilişkili değişiklikler üzerindeki bilgiler beyinde kolinerjik nöronların fonksiyonunun yaşlanma etkisiyle muhtemelen bozulabildiğini göstermiştir⁽¹¹⁰⁾. Bu yüzden beyinde yaşlanma ile ilişkili transport fonksiyonlarını moleküler düzeyde aydınatabilecek bir diğer yaklaşım da ACh'in inaktivasyonunda rol alan membrana-bağlı transport enzimlerinden Asetilkolinesteraz (AChE)'in etkisini araştırmaktır. Literatürde beyin Na^+ , K^+ -ATPaz ve Ca^{2+} -ATPaz aktivitelerinde farklı bulgular bildirildiği halde AChE aktivitelerinde azalma olduğu bildirilmiştir^(112,180,202,203).

Membran fonksiyonunda giderek önem kazanan bileşikler, plazma membranının dış yüzündeki glikoproteinlerin ve gangliosidlerin kompleks karbonhidratlarıdır. Bu membrana-bağlı gliko bileşiklerinin terminal şeker kalıntılarından biri sialik asid (SA)'dır. Beyin membranlarında yüksek düzeyde bulunan⁽⁴⁷⁾ SA, membranın negatif elektrik yükünden sorumlu olup, katyon bağlanması, transport, permeabilite⁽¹⁴⁾ ve karbonhidratların tanınmasıyla ilgili çeşitli biyolojik fonksiyonlarda temel rol oynar ve sıklıkla reseptörlerin ve

antijenik bölgelerin tanınmaması veya maskelenmesinde görev yapar⁽¹⁷¹⁾. Ayrıca SA, insülin, serotonin, opiyat ve interferon reseptörlerinin bileşiminde bulunur ve sinir iletilsinin devamı için gereklidir⁽¹⁹⁶⁾. Frontal korteks ve hipokampusun oldukça yüksek sializasyonu olduğu gösterilmiştir. Beyin plazma membranlarının sializasyonu, MSS'nin normal gelişimi ve fonksiyonu için temel koşullardan biridir. Oligosakkarid zincirlerindeki SA, enzimlerin moleküler biçimlerini stabilize edebilir ve onları proteolitik yıkıma karşı korur⁽⁴⁷⁾. Sinir uçlarındaki SA kalıntılarının, transmitter salgılanımı için intrasellüler Ca^{2+} sağlayan fonksiyonel depolanım bölgesi olabileceği düşünülmektedir⁽¹²⁵⁾. Eritrosit ve trombosit membranlarında SA kaybının, bu hücrelerin dolaşımdan uzaklaştırılmasının nedeni olabileceği düşünülmüş ve bunun yaşlanma ile bağlantılı olabileceği ileri sürülmüştür^(189,199).

Son yıllarda birçok araştırmacı adrenerjik düzenlenen, nöroendokrin bez olan pineal bezin ve onun melatonin (MLT) salgısının hem yaşlanma hem de yaşla-ilişkili hastalıklarda rolü olduğunu bildirmişlerdir. Yaşlanmanın pineal bezin serotoninini MLT'e metabolize etme ve salgılama yeteneğini etkileyen en önemli faktör olduğu düşünülmektedir⁽¹⁵¹⁾. Çeşitli çalışmalarla pineal bezin fonksiyonu ve morfolojisinde, yaşlanma ile ağır ağır ilerleyen bir bozulma olduğu gösterilmiştir^(115,149,150,156,200). Bunlar içinde en göze çarpan değişikliklerden biri, kemiricilerde^(149,190,194) ve insanlarda^(84,166,208) pineal bezin MLT yapımındaki aşamalı azalmasıdır. Bununla beraber, yaşlanma olayına bağlı olarak pineal fonksiyonda azalmayla ilişkili mekanizmalar ve yaşlanmaya bağlı vücut değişikliklerinin pineal yetmezliğe karşı sekonder olup olmadığı aydınlatılamamıştır. Pineal MLT yapımında, yaşla ilişkili azalmanın nedenleri açık değildir. MLT, ileri derecede lipofilik bir molekül olması nedeniyle kan-beyin bariyeri ve hücre membranlarından kolaylıkla geçebilir. İntraperitoneal (i.p) verilen MLT'in kolaylıkla MSS'ne girdiği ve glutamat reseptör agonisti Kainat'ın eksitotoksik etkisini azaltarak nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir^(2,61,204). MLT'in birçok hayvanda sirkadyen ritmi veya mevsimsel üremede önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Buna karşılık

insanlarda, fizyolojik rolü ve gelişim esnasındaki olası değışiklikleri hala etraflıca anlaşılamamış olmasına rağmen, MLT son zamanlarda yaşlanmaya, uykusuzluğa, strese, immun bozukluklara, uzun mesafe uçak yolculuğunun objektif ve subjektif semptomlarına (jet-lag) ve kansere karşı 'harika bir ilaç' olarak büyük çapta toplumsal bir ilgi kazanmıştır. Yakın zamanda MLT'in yaşlanma önleyici bir ajan olduğu ileri sürülmüştür^(8,28,63,132,135,156). MLT verilen kemiricilerde, yaşlanma hızı ve yaşla ilgili hastalıkların başlangıcının geciktirilebileceği bildirilmiştir⁽¹⁵³⁾. MSS'nde MLT'in etki mekanizması aydınlatılamamıştır. Hormonun, nörotransmitter sistemlerin ve beynin membran olaylarının modülasyonu yolu ile nöronal aktivitenin etkileniminde bir rolü olduğunu destekleyen çalışmalar vardır⁽³⁷⁾.

Bu çalışma; postnatal gelişen çeşitli yaş gruplarındaki sıçanlarda yaşlanmaya bağlı olabilecek sinaptozomal transport fonksiyonlarının, MSS üzerine nöroprotektif etkili ve yaşlanmayı önleyici bir ajan olduğu ileri sürülen MLT'in eksojen verilışı ile ne yönde etkilenebileceğini incelemek için planlandı. Bunun için membrana bağlı Na⁺,K⁺-ATPaz, Ca²⁺-ATPaz ve AChE aktivitelerini ve nöral membranın önemli bir yapısal bileşici olan SA düzeylerini incelemek yoluyla bu nörohormonun gelişmekte olan sinir dokusunda bilinmeyen etkilerinin aydınlatılabilmesi amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

Nöral Membran Yapısı ve Fonksiyonu

Ökaryot ve prokaryot bütün hücreler 75-100Å kalınlığında bir membranla çevrilidir. Hücre membranı (plazma membranı) hücre içindeki iyon ve moleküllerin konsantrasyonlarını yaşam için uygun bir düzeyde tutan ve yabancı moleküllere karşı doğal bir engel oluşturan ileri derecede seçici geçirgen önemli bir hücre elemanıdır. Böylece plazma membranı metabolik ara maddelerin oldukça yüksek sitoplazmik konsantrasyonlarda kalmasını ve intrasellüler boşluğun oluşumunu sağlar. Ayrıca membranın hücre gelişimi, bölünmesi ve metabolizmasında da fonksiyonları vardır. Biyokimyasal olarak membranlar lipid, protein ve karbonhidrattan yapılmıştır. Membranın bu bileşenlerinin oranı bir membrandan diğerine büyük çapta değişmekle birlikte yaklaşık %43'ünü lipidler, %49'unu proteinler ve %8'ini karbonhidratlar oluşturur⁽¹⁴⁶⁾ (Tablo 1). Membran bileşimindeki değişiklik membranın fonksiyonunu yansıtır. Birçok membran proteinleri enzim olduğundan iç mitokondrial membran gibi yüksek protein içeriği olan membranlar metabolik olarak aktiftirler. Buna karşılık miyelin membranı gibi lipitten zengin membranlar başlıca yalıtım fonksiyonu yapar.

Membranın başlıca lipidleri, fosfolipidler, sfingolipidler ve kolesteroldür. Plazma membranında diğer membranlara göre daha fazla kolesterol ve sfingomiyelin vardır. Bunlara ek olarak hücre membranı en yüksek glikoprotein ve glikolipid içeriği olan membrandır, bu nedenle kolesterol, sfingomiyelin, glikoprotein ve glikolipidin varlığı çoğunlukla plazma membranı tanısı olarak kullanılır.

Tablo 1. Çeşitli biyolojik membranların lipid, protein, karbonhidrat içerikleri (% kuru ağırlık olarak)

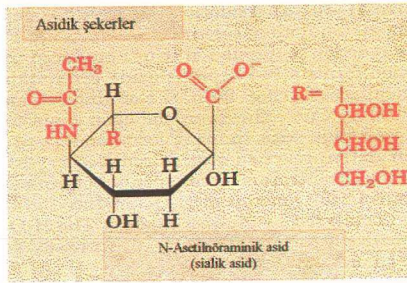
	<i>Lipid</i>	<i>Protein</i>	<i>Karbonhidrat</i>
Plazma membranı (memeliler)	43	49	8
Miyelin	75	22	3
Mitokondri dış membranı	48	52	eser
Mitokondri iç membranı	24	76	eser
Nukleus membranı	35	59	3
Endoplazmik retikulum	44	54	2

Uyarılan membranlardan olan SPM’nda lipid/protein oranı 1’dir ve kolesterolün polar lipidlere molar oranı 0.44’tür. Gangliozydler, total bileşiklerin %5 kadarını oluşturur. Fosfatidiletanolamin (FE) ve fosfatidilkolin (FK) en bol bulunan yüklü lipidlerdir⁽³⁵⁾ (Tablo 2). Daha az oranda bulunan diğer belli başlı yüklü lipid fosfatidilserin (FS)’dir. Yağ asidi bileşimleri ileri derecede farklılık gösterir. FE ve FS yüksek miktarlarda çok doymamış yağ asitleri içerir. Yağ asidi yan zincirleri en sıklıkla C-16 ve C-24’tür.

Tablo 2. Sinaptik plazma membran fraksiyonunda bulunan lipid türleri

<i>Tür</i>	<i>Totalın (%)</i>
Fosfatidiletanolamin	28
Fosfatidilkolin	34
Fosfatidilserin	10
Fosfatidilinositol	2
Sfingomiyelin	3
Lizofosfatidilkolin	1
Kolesterol	19
Seramid	2

Diğer yüklü moleküller sialik asid içeren molekül ya da proteinlerden oluşabilir. Polianyon ya da hücre membranlarının reseptörleri olarak çok önemli fonksiyonları olan SA’ler, beyin membranlarında yüksek düzeylerde bulunur. Hayvansal hücrelerin çoğunun dış yüzeyi negatif yüklüdür. Membranların bu negatif yükü büyük çapta SA’in karboksil gruplarından ileri gelir (Şekil 1.).

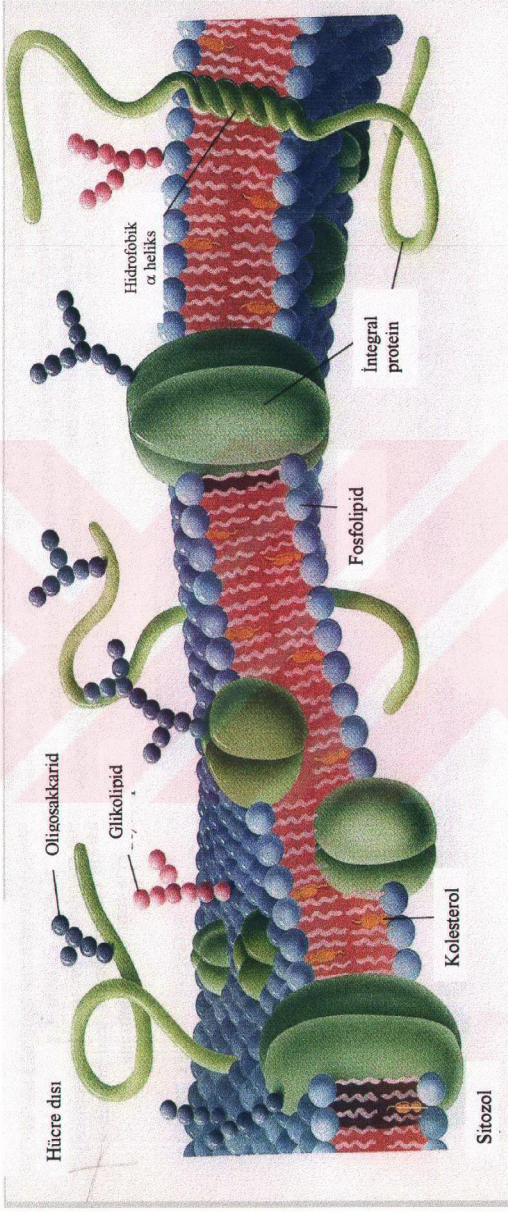


Şekil 1. Sialik asid (N-Asetilnöraminik asid)

SA'nin karboksil gruplarındaki negatif yük Ca^{2+} bağlar. Hücre yüzeyinden SA'nin nörominidazla uzaklaştırılışının, Ca^{2+} alışı-verişini arttırdığı ve membran potansiyalinin stabilitesini azalttığı gösterilmiştir⁽¹²³⁾. SA'lerin sinir uçlarının yüzeyinde Ca^{2+} hapsedilmesi yoluyla membran stabilitesine katıldığı ve transmitter salgı-lanımında önemli rolü olabileceği düşünülmüştür⁽¹²⁵⁾. SA içeriğinin yaşlanmayla ilişkisi konusunda yok denecek kadar az olan çalışmalarda dolaşımdaki hücre membranlarının SA düzeylerinde yaşla ilişkili azalma gösterilmiştir. Erken post-natal sıçan beyinde polisialozil glikopeptitlerin en yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu, ilk ay içinde yaklaşık %75'inden fazlasının azaldığı gösterilmiş ve beyinde önemli gelişimsel değişiklikler oluştuğunda kompleks karbonhidratların erişkin düzeylerine eriştiği bildirilmiştir⁽¹⁰⁶⁾.

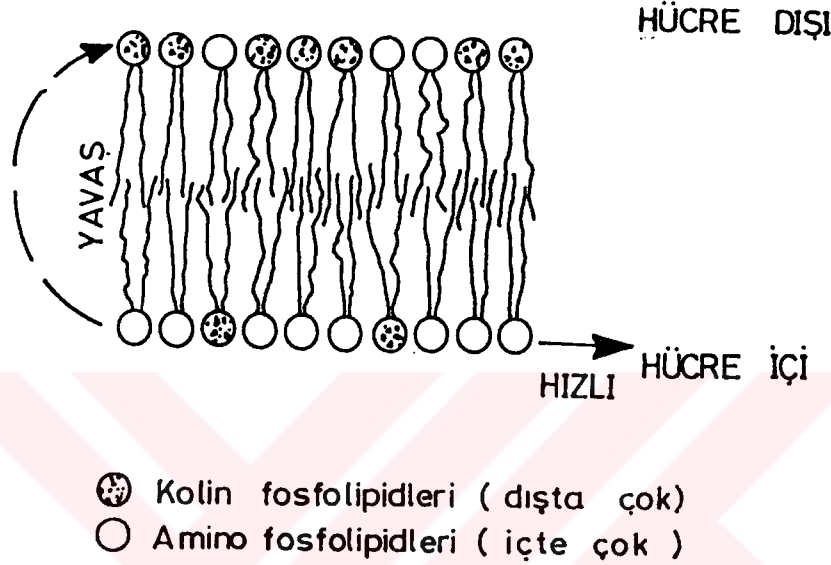
SPM'larındaki polipeptit bileşenlerinin 40.000-200.000 dalton arasında değişen molekül ağırlıklı farklı zincirlerden oluştuğu bulunmuştur. Ancak 50.000 ve 100.000 molekül ağırlığında polipeptitler baskındır. Yaklaşık 100.000 molekül ağırlıklı Na^+ , K^+ -ATPaz hariç polipeptitlerin bileşimi belirlenememiştir. Membran proteinlerinin total amino asid (a.a.) bileşimi yüklü a.a.'lerce zengin-dir.

Bugün için en inandırıcı membran yapısı modeli 1972'de Singer ve Nicolson⁽¹⁷⁹⁾ tarafından ileri sürülen akışkan mozaik modelidir (Şekil 2.). Bu mo-



Şekil 2. Plazma membrani yapısı⁽²²⁾.

dele göre fosfolipidler çift tabaka oluştururlar. Fosfolipid moleküllerinin hidrofo-
bik non polar grupları biri diğerine karşı gelecek şekilde dizilirler ve çift ta-
bakanın merkezini oluştururlar. Hidrofilik polar gruplar membranın ekstra ve
intraseküler yüzeylerini oluşturmak üzere dizilmişlerdir. Kolinli fosfolipidler
(FK ve sfingomiyelin) başlıca çift tabakanın ekstrasellüler yüzeyinde; halbuki
aminofosfolipidler (FE ve FS) sitoplazmik yarısında yoğunlaşmışlardır (Şekil 3.).



Şekil 3. Plazma membranındaki fosfolipid çift tabakasının şematik gösterilişi.

Kolesterol, fosfolipid moleküllerinin arasına sokulmuştur (Şekil 2.). Fos-
folipidlerin lipid çift tabakasının lateral düzlemi boyunca hareketi membranın
akışkanlığını sağlar. Membranın akışkanlığı fosfolipidlerdeki yağ asitlerinin
bileşimi ile sağlanır. Kısa zincirli ve doymamışlığı fazla yağ asitleri, uzunlardan
ve doymuşlardan daha akıcıdır. Membran yapısında bulunan kolesterolün de za-
rın akışkanlığını azaltıcı bir etki yaptığı kabul edilmektedir⁽⁴¹⁾. Normal akış-
kanlığı korumak için optimal bir fosfolipid-kolesterol oranı gerekmektedir.

Membran proteinleri, yüksek miktarlarda L-heliks oluşturan ve lipid çift
tabakası içine değişken ve asimetric olarak gömülü olan globüler proteinlerdir
(Şekil 2). Bu bakımdan membran proteinleri integral (intrinsik) ve periferik (eks-
trinsik) olarak sınıflandırılabilir. İntrinsik proteinler membran içerisine
gömülüdürler ve burada lipidlerle hidrofobik etkileşimler oluştururlar ve bunlar

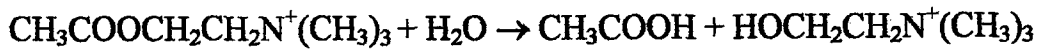
yalnızca deterjanlar, aseton gibi çözücüler veya metanol ve kloroform karışımları ile karşılaşınca serbestleşirler. İç mitokondrial membranın elektron transport zinciri kompleksleri, eritrositlerin glikoforini, Na^+, K^+ -ATPaz, intrinsik membran proteinlerine örnektir. Ekstriksik proteinler membrana elektrostatik kuvvetlerle daha gevşekçe tutunurlar. Eritrositlerin spektrini, miyelinin bazık proteini sitokrom c ve AChE ekstriksik membran proteinlerine örnektir.

Duyu sistemlerinde sinir impulslarının geçirilişi ve sinyal iletişi; biyolojik membranların özelliklerine, onların reseptör ve ileti proteinlerine ve de membranlardan geçen iyon farklarına dayanır. Nöronlar sinir impulslarının geçirilişlerinden sorumludur. Sinir impulsları veya aksiyon potansiyelleri nöronun aksonunda aşağı doğru hareket eden bir depolarizasyon dalgası şeklinde yayılır. Bu durumda plazma membranının her segmenti komşu segmentini depolarize eder. Bir nöronun aksiyonunun plazma membranı, voltajdaki değişikliklere yanıt olarak açılıp kapanan iyon kanalları içerdiğinden depolarizasyon yeteneğine sahiptir. Hücre membranlarından geçen elektrokimyasal iyon farkları, aksiyon potansiyelinin yayılmasının temelini oluşturur.

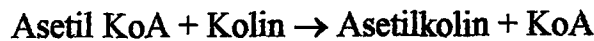
Sinir impulsları diğer nöronlara ya da kas hücrelerine veya salgılayıcı hücrelere sinaps denilen değinme bölgelerinde iletilirler. Bir sinapsta presinaptik membran (bir nöronun akson terminali) postsinaptik membrandan (bir kas hücresi, bir salgılayıcı hücre veya ikinci bir nöronun dendiridi) sinaptik yarık denilen bir boşlukla ayrılır. Aksonun sonunda presinaptik membrana gelen elektriksel bir sinyal akson terminalindeki, sinaptik keseciklerin içinde bulunan bir nörotransmitterin salıverişini tetikler. Nörotransmitterler sinaptik yarığa salgılanır ve postsinaptik membranda bulunan nörotransmitterler reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma, nörotransmitter reseptöründe biçimsel bir değişikliği tetikleyerek hücre membranının küçük bir bölgesinde Na^+ 'a karşı K^+ için olandan yaklaşık 500 kat daha fazla permeabilite artışına ve böylece, postsinaptik hücreye Na^+ girişine sebep olur. Bu giriş postsinaptik membranın elektriksel özelliklerinde, depolarizasyon denilen bir değişikliğe sebep olur ve sinyalin yayılmasına yol açar. Nöronlar içindeki normal Na^+ ve K^+ 'a ait iyonik asimetrliler Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesiyle sürdürülürler. Sinir sisteminde Na^+, K^+ -ATPaz Ran-

vier düğümleri dahil yüksek iyonik akışlı membran bölgelerinde ve ince aksonal olaylarda dendridlerde ve glial membranlarda yoğunlaşmıştır. Na^+, K^+ farkları membranın negatif olan iç membran potansiyalini oluşturur. Omurgalıların nöronal hücre membranlarının dinlenme potansiyali -70 mV kadardır. Aksiyon potansiyalinin sonunda membranın dinlenme potansiyaline geçişi, konsantrasyon farklarını düzelten Na^+, K^+ -ATPaz yoluyla olur.

ACh, nöromusküler kavşakta ve kolinerjik sinirlerde bulunan bir nörotransmitterdir. Dinlenme durumunda ACh, sinaptik keseciklerde depolanır ve uyarı durumunda serbestleşir. Her bir keseciğin deneysel olarak parçalanması ile yaklaşık 5×10^6 molekül ACh serbestleşir. Sinir impulsunun aksondan aşağı akışı, böyle birçok ACh paketlerinin sinaptik yarığa serbestleşmesine sebep olur. Serbestleşen ACh, sinaptik boşluğa yayılır ve postsinaptik membranda yerleşmiş ACh reseptör proteinine etki eder, biçimsel bir değişiklik oluşturarak Ca^{2+} iyonlarının salıverilişine sebep olur. Bu iyonlar sonra membran fosfogliseridi ile etkileşerek membranda Na^+ ve K^+ 'a karşı permeabilite artışına sebep olurlar. Böylece serbestleşen her ACh molekülü başına, membrandan orjinal impulsun büyük bir artışına sebep olan binlerce katyon geçer. Dinlenme durumuna dönüş, AChE'nin ACh'ı, asetat ve koline hidrolizi ile olur⁽¹⁴⁶⁾.



Böylece membran orijinal durumuna döner. ACh, kolinasetil transferaz ile yeniden sentezlenir ve depo edilir.



MEMBRANA BAĞLI TRANSPORT ENZİMLERİ

*Asetilkolinesteraz (E.K. 3.1.1.7.)**

AChE sinir sisteminde bulunan sinaptozomal membrana bağlı önemli bir enzimdir. Başlıca kolinergik sinaptik transmisyonunda rol alan hücrelerle ilişkilidir. Ayrıca eritrositlerde de bulunur. Hayvan dokularında bulunan AChE'nin asimmetrik (A_4 , A_8 , A_{12}) ve globüler (G_1 , G_2 , G_4) olmak üzere iki farklı katalitik alt üniteleri vardır. Asimmetrik moleküller (A_4 , A_8 , A_{12}) kollajene benzer bir kuyruk yapısıyla birleşmiştir. Bunlar deterjanlarla etkileşmeyip yüksek tuz konsantrasyonu içeren tamponlarda serbestleşebilirler. Asimmetrik tipler başlıca iskelet sisteminde nöromusküler kavşakta yerleşmişlerdir⁽¹⁶⁷⁾. Bu yerleşimin kollajene benzeyen kuyruk yapısı ile ekstrasellüler bazal membranın etkileşimi tarafından düzenlendiği sanılıyor. G_1 , G_2 , G_4 globüler tipleri çok daha geniş çapta dağılmıştır. Bu tipler kollajene benzer yapısı olmayan katalitik alt ünitelerdir. Globüler tipler iki gruba ayrılabilir: Ekstraksiyonu takiben iyonik olmayan deterjanlarla reaksiyonlaşabilen tip, integral membran proteini olarak bulunur. Çözünür protein olan deterjana bağlanmayan tip ise sinir ve kas hücreleri tarafından salgılanır. Deterjana bağlanan globüler tipler hidrofob protein olarak da sınıflandırılabilir. MSS'de membrana bağlı tetramerik globüler tür (G_4) baskındır. Değişken miktarlarda monomerik (G_1) ve dimerik (G_2) globüler yapılarla birlikte bazen de küçük miktarlarda asimmetrik tip bulunur.

Allosterik bir enzim olan AChE'nin ACh'i hidrolizinin yapım yıkım sayısı, enzim katalizi için bildirilen en yüksek değerler arasında, $>10^4 \text{sn}^{-1}$ olarak bildirilmiştir⁽¹⁹⁸⁾. Aşırı substrat miktarı hidroliz hızını inhibe eder. Biyokimyasal ve hız açısından bakıldığında AChE çok özgün bir hidrolitik enzimdir. Evrimsel gelişimi bakımından mükemmel bir enzim olarak tanımlanmaktadır⁽¹⁹⁸⁾. AChE'nin

*Enzim komisyon no:

AChE (3.1.1.7.)

Her enzim numarası 4 rakamdan oluşur. İlk rakam enzimin 6 temel enzim sınıfından hangisine ait olduğunu gösterir. İlk rakamı 3 olan enzimler Hidrolazlardır. İkinci rakam temel enzim sınıfının alt sınıfını gösterir. Hidrolazlar için hidroliz olan bağın tipini gösterir. Bu bağ ester bağıdır, yani 3.1 ile başlayan enzimler ester bağlarını hidroliz ederler. Üçüncü rakam daha alt sınıfını (2. alt sınıfını) gösterir, bu rakam daha kesin olarak hidroliz olan bağın tipini gösterir. Buna göre 3.1.1. nolu enzimler karboksilik ester hidrolazlardır. Dördüncü rakam, enzimin ikinci alt sınıfındaki seri numarasıdır ve her enzim için spesifiktir.

aktif bölgesindeki nükleofilik serin kalıntısı nükleofilik reaksiyonun 1.basamağında ACh ile reaksiyonlaşarak asetil-enzim aramaddesi oluşur ve kolin açığa çıkar. 2.basamakta asetil-enzim ara maddesinin hidrolizi ile asetik asid oluşur ve enzim yeniden sentezlenir. ACh'nin hızlı hidrolizi postsinaptik membranın yaklaşık 1 msn'de tekrar repolarize olmasını sağlar⁽¹⁴⁶⁾.

İyon Transport ATPaz'lar

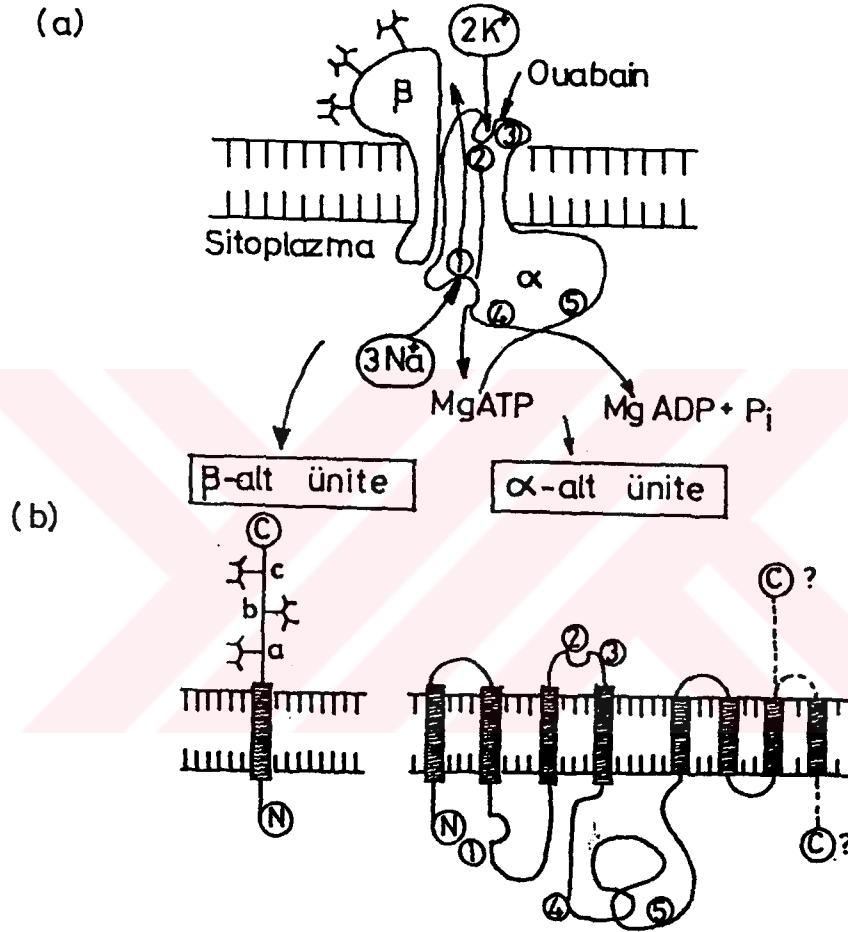
Ökaryotik hücrelerin plazma membranlarının integral hidrofobik proteinleri iyon transport ATPaz'lardır. Bu ATPaz'lar "P", "V" ve "F" tipi olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar. Reaksiyon sikluslarının bir yerinde fosforillenen P tipi ATPaz'lardan en iyi bilineni Na^+, K^+ -ATPaz'dır (Tablo 3).

Tablo 3. Ökaryotik hayvansal hücrelerin plazma-membranı iyon transport ATPaz'ları (P sınıfı)⁽¹¹⁴⁾

<i>Tipi</i>	<i>İnhibitörü</i>	<i>Subsellüler Lokalizasyonu</i>	<i>Alt birim Bileşimi(kDa)</i>	<i>Başlıca Fonksiyonları</i>
Na^+, K^+ -ATPaz *	{ Ouabain Vanadat iyonu	Plazma membranı (hayvan hücreleri)	α 112 β 55	İntra ve ekstrasellüler hücre hacmi, uyarılabilir hücrelerde intrasellüler Ca^{2+}
Ca^{2+} -ATPaz	{ Vanadat iyonu Vanadat iyonu Vanadat iyonu	{ Sarkoplazmik Retikulum Endoplazmik Retikulum Plazma membranı	{ 100 ? 140	{ İntrasellüler Ca^{2+} düzenlemesi $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ değiştiricisi
H^+ -ATPaz	{ Vanadat iyonu	Mesane plazma membranı (hayvan hücreleri)	100	Ekstrasellüler pH düzenlenmesi

$Na^+,K^+-ATPaz$ (E.K.3.6.1.3)*

Hücre membranlarından geçen Na^+,K^+ iyon farklarının korunması, sinir uyarılabilirliğinin altında yatan temel olaydır. Bu asimetrinin korunmasından sorumlu olan $Na^+,K^+-ATPaz$ enzimi nöronların fonksiyonlarında önemli bir rol oynar. Bu iyon gradienti nöronların osmotik hasardan korunmasına da yardımcı olur.



Şekil 4. (a)Plazma membranında $Na^+,K^+-ATPaz$ 'ın α ve β alt ünitelerinin yerleşimi.(b)Alt ünitelerdeki bağlanma bölgeleri: 1) Na^+ bağlanma , 2) K^+ bağlanma, 3) Ouabain bağlanma yeri, 4) Fosforilasyon bölgesi, 5) ATP bölgesi

* $Na^+,K^+-ATPaz$ (3.6.1.3.)

3. Enzimin ait olduğu temel enzim sınıfıdır

: Hidrolaz

3.6. Hidroliz olan bağın tipidir

: Asid-anhidrid bağı

3.6.1. Hidroliz olan bağın daha keskin tipi

: Fosforil kapsayan anhidridler

3.6.1.3. Enzimin ikinci alt sınıfındaki seri numarası

: Nükleotidlere etkili

Enzimin Yapısı

Na^+, K^+ -ATPaz integral bir membran proteindir. Yapısında 112 kDa büyüklüğünde bir polipeptid (α -katalitik alt birimi) ve 40-60 kDa büyüklükte bir glikoprotein (β -alt birimi) bulunur. α -alt birimi 4-8 transmembran bölüm ile bunları birleştiren sitoplazmik veya ekstrasellüler taraftaki polipeptit zincirlerinden oluşur. Enzimin bilinen tüm katalitik fonksiyonları α -alt birimince gerçekleştirilir⁽¹⁶⁴⁾. α -alt biriminde K^+ ve Ouabain bağlanma bölgeleri ekstrasellüler tarafta, Na^+ , ATP bağlanma ve fosforilasyon bölgeleri ise sitoplazmik tarafta bulunur (Şekil 4). β -alt birimi membrandan yalnızca bir kez geçer⁽¹⁶⁴⁾. α -alt birimi⁽¹⁶⁵⁾ ve β -alt biriminin⁽⁶²⁾ komplementer DNA'ları karakterize edilmiş ve böylece a.a. dizilişleri belirlenmiştir.

Enzimin Fizyolojik Fonksiyonu⁽¹⁸³⁾

a) Membran Potansiyeli

Membranın K^+ 'a permeabilitesinin Na^+ 'dan fazla olması, membranın içi ve dışı arasında içte negatif olmak üzere bir membran potansiyeli oluşturur.

b) Osmotik Düzenlenim

Membran potansiyeli negatif olduğunda, membrandan geçebilen anyonların konsantrasyonu intrasellüler tarafta düşüktür. Bu durum membrandan geçemeyen anyonların osmotik etkisini kompanse eder.

c) Sekonder Aktif (yokuş yukarı) Transport

Na^+ gradienti, şekerler, a.a.'ler, Cl^- veya K^+ ile Cl^- 'un ko-transportunu veya simportunu ve Ca^{2+} ve H^+ 'in de antiportunu sağlar.

d) Yüksek İntrasellüler K^+ düzeyi

Yüksek intrasellüler K^+ düzeyi bazı intrasellüler enzimatik reaksiyonlar için gereklidir.

e) Reabsorbsiyon İşlemleri

Luminal membranda Na^+ gradienti ile yürüyen sekonder aktif transportun bazolateral membranda aktif Na^+ transportu ile birleştirilmesi, ince barsak ve böbrek hücrelerinde reabsorbsiyon için çok önemlidir.

Enzimin Özellikleri

Na^+, K^+ -ATPaz'ı diğer birçok ATPaz'dan ayıran özelliği, aktivitesi için hem Na^+ , hem K^+ 'un birlikte varlığının gerekmesidir. Hem transport sistemi hem de Na^+, K^+ -ATPaz enzimi, membranın iç yüzünde Na^+ iyonları, dış yüzünde de K^+ iyonları ile aktive olur⁽¹⁸⁾. Optimal enzim aktivitesi için Na^+/K^+ oranı 10:1 ile 5:1 arasında, pH ise 7.0-7.5 arasında olmalıdır. Na^+ varlığı şarttır, fakat diğer birçok iyon K^+ yerine geçebilir ve etki gösterebilir. Etki gücü bakımından, azalan etki gücüne göre sıralama, $\text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+$ şeklindedir⁽¹⁸²⁾.

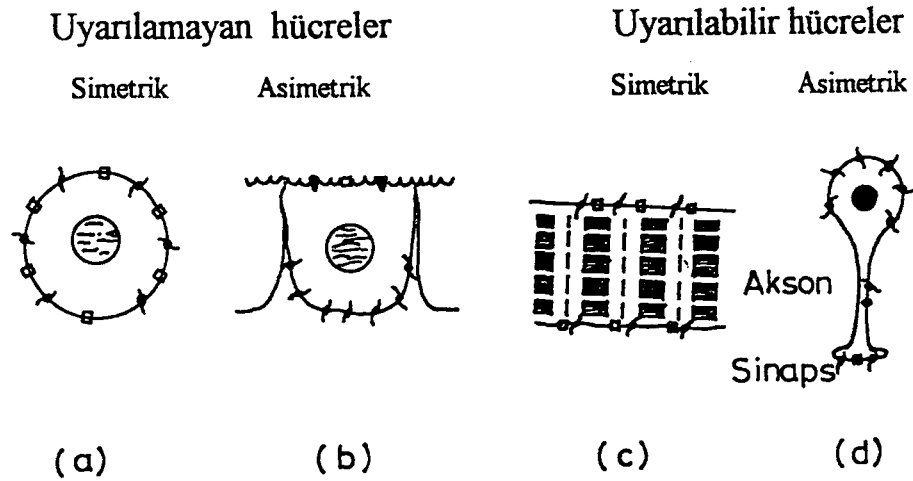
ATP, Na^+, K^+ -ATPaz'ın başlıca substratıdır ve ATP ile ilişkili birçok reaksiyonda olduğu gibi, enzimin Mg^{2+} 'a gereksinimi çok yüksektir. Mg^{2+} konsantrasyonu substratın konsantrasyonuna yaklaşık olarak eşit olduğunda optimal enzim aktivitesi elde edilir. Enzimin Mg^{2+} -ATP kompleksi üzerine maksimal aktivite göstermesi için Mg^{2+} ve ATP konsantrasyonları genellikle ekimolar olmalıdır⁽¹⁸¹⁾. Mg^{2+} veya ATP diğerine göre fazla miktarda olduğunda inhibisyon görülür⁽¹¹⁶⁾.

Enzimin Reaksiyon Mekanizması

Na^+, K^+ -ATPaz reaksiyonunun tümü, ATP'nin ADP ve inorganik fosfata (P_i) hidrolizini ve hidroliz olan her ATP molekülü başına 3 Na^+ iyonunun ekstrasellüler kompartmana transportu ile birlikte, 2 K^+ iyonunun intrasellüler kompartmana transportunu kapsar⁽⁹³⁾. ATP'nin hidrolizi ve buna paralel olarak iyonların taşınması çok aşamalı bir reaksiyon dizisidir. Bu da, kısaca enzimin Na^+ -bağımlı fosforilasyonu ve fosfoenzimin K^+ -bağımlı hidrolizinden oluşmaktadır⁽⁵⁴⁾. Bu enzim ve benzeri "P" tipi ATP'azlarda fosforillenmiş ara ürünlerin oluşması ve hidrolizi çok önemli rol oynar⁽¹⁶⁴⁾.

Na^+, K^+ -ATPazın Hücrelerde Yerleşimi

Enzim yerleşimi organizmadaki hücre tiplerine göre farklılıklar gösterir (Şekil 5).



Şekil 5. Na^+, K^+ -ATPaz'ın farklı hücrelerde yerleşimi. Uyarılamayan hücreler: (a) Epitelyal olmayanlar (ör. Fibroblast, yağ hücresi, lökosit, eritrosit), (b) Epitelyal olanlar (ör. Böbrek ve barsak hücreleri). Uyarılabilen hücreler: (c) Kas hücresi, (d) Sinir hücresi.

Na^+, K^+ -ATPaz İnhibitörleri⁽¹⁸³⁾

1. Kardiak glikozidler
2. Vanadat
3. Oligomisin
4. Düşük dozda kalsiyum⁽¹⁸¹⁾

Na^+, K^+ -ATPaz Düzenlenimi⁽¹⁶⁴⁾

1. Direkt Etkili Maddeler:

- a) İntrasellüler Na^+
- b) Ekstrasellüler K^+
- c) ATP
- d) Ouabain ve hipotalamik ouabain-benzeri maddeler

2. İndirekt Etkili Maddeler:

A) Na^+, K^+ -ATPaz Gen Ekspresyonu İndüksiyon Yapanlar

- Aldosteron
- Kortikosteron
- Kortizol
- Tiroid hormonu

B) Var Olan Enzimlerde Post-Translasyonel Modifikasyon Yapanlar

- Progesteron
- İnsülin
- Glukagon
- Vazopressin
- Epidermal Büyüme Faktörü
- Katekolaminler

Ca^{2+} -ATPaz

Hücre membranlarında bulunan diğer bir sınıf ATPaz mM konsantrasyonlarda Ca^{2+} ya da Mg^{2+} 'la aktiflenen ve substrat olarak ATP'yi kullanan $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPaz çoğunlukla Ca^{2+} -ATPaz, Mg^{2+} -ATPaz, bazal ATPaz, bazik ATPaz veya nonspesifik ATPaz olarak adlandırılır. $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPaz, Ca^{2+} ile uyarılan ATPaz'dan farklı olduğu halde farklı tür ve dokuların $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPaz'larının aynı aileye ait olup olmadığı açık değildir. Ca^{2+} -ATPaz'ın Ca^{2+} varlığında enzim aktivitesini yansıttığı, halbuki Mg^{2+} -ATPaz'ın Mg^{2+} varlığında enzim aktivitesi gösterdiği dikkate alınmalıdır. Bazı araştırmacılar pankreas, vasküler düz kas, iskelet kası, karaciğer, beyin korteksi, meme bezleri ve böbrek korteksi $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPaz'ları ile yaptıkları çalışmalarda Ca^{2+} -ATPaz ve Mg^{2+} -ATPaz aktivitelerinin tek bir enzimi ifade ettiğini ileri sürmüşlerdir⁽⁴³⁾. Buna karşılık kalp sarkolemması, hepatoma hücreleri ve beyin sinir uçları $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPaz'ları ile ilgili çalışmalarda, Ca^{2+} -ATPaz ve Mg^{2+} -ATPaz'ın iki ayrı enzim olduğu gösterilmiştir. Ca^{2+} -ATPaz ve Mg^{2+} -ATPaz'ın ayrı enzimler mi yoksa onların aktiviteleri $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPaz

gibi tek bir enzim kompleksinin ifadesi mi olduğu sorusuna yakın literatür incelemelerinde kesin yanıt bulunamamıştır.

Ca^{2+} ile uyarılan ATPaz ilk defa Dunham ve Glynn⁽⁴⁶⁾ tarafından eritrosit membranlarında saptanmış, sonraları beyin^(57,64,113,129,130,169) dahil birçok dokuda gösterilmiştir⁽⁴³⁾.

Normal hücre fonksiyonunun sürdürülmesi için düşük intrasellüler serbest Ca^{2+} konsantrasyonlarının korunması gereklidir. Ekstrasellüler serbest Ca^{2+} , intrasellüler serbest Ca^{2+} ’undan (yaklaşık 0.1 μM) yaklaşık 10^4 defa daha fazladır (yaklaşık 1.5 mM). Bu farkın nedeni, Ca^{2+} ’un iyon gradyeni yönünde sürekli hücrelere sızması ve oradan aktif olarak dışarı atılmasıdır. İntrasellüler Ca^{2+} düzenlenmesinden sorumlu başlıca hücre komponenti plazma membranıdır. Bu bakımdan görev yapan iki büyük plazma membranı komponentinden biri $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değiş-tokuş sistemi, diğeri ise Ca^{2+} pompalayan ATPaz’dır. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değiştiricisi yüksek kapasitelidir, fakat serbest Ca^{2+} ’a ilgisi düşüktür ve uyarılabilen hücrelerde aktiftir. Plazma membranı Ca^{2+} -ATPaz’ı serbest Ca^{2+} ’a yüksek ilgili olduğu halde, pompalama kapasitesi daha düşüktür. Bu nedenle Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPaz’ın intrasellüler Ca^{2+} ’un hassas ayarlanmasında, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değişimi sisteminin ise hücreye giren fazla Ca^{2+} ’un hızla atılımından sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Sinaptozomlarda ve presinaptik düzeyde ATP hidrolizine eşlik eden Ca^{2+} transportunun, sinir hücrelerinde düşük sitozolik Ca^{2+} düzeylerinin sürdürülmesinde rol alan önemli bir mekanizma olduğu gösterilmiştir^(88,113). Ca^{2+} sinir hücresi sonrasında aksiyon potansiyellerinin oluşumuna sebep olduğu gibi, nörotransmitter salgılanımında ve böylelikle sinir hücresi uyarılabilirliğinde ikinci haberci olarak temel bir rol oynar^(23,88,113).

Sitozolik Ca^{2+} normalde ya plazma membranına bağlı ve Ca^{2+} ’u dışarıya doğru pompalayan ya da intrasellüler membranlara bağlı ve Ca^{2+} ’un sitozolden intrasellüler organellere aktif transportunu sürdüren Ca^{2+} -ATPaz aracılığıyla korunur. Çeşitli sinyal iletim mekanizmalarının aktivasyonu, Ca^{2+} ’un ekstrasellüler ortamdan pasif difüzyon veya intrasellüler depolardan özel kanallar yolu ile sitozole difüzyonu, sitozolik Ca^{2+} ’u artırır. İletim sinyallerinin inakti-

vasyonunu takiben transport ATPaz'ları sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunu tekrar düşürmek için çalışır. Bu fonksiyona Na^+ - Ca^+ değiş-tokuş proteinleri de katılır. Önceden oluşan Na^+ farkından açığa çıkan serbest enerji Ca^{2+} 'un dışarı transportu için kullanılır.

Ca^{2+} homeostazisinin düzenlenmesinden sorumlu Ca^{2+} -ATPaz, aktivitesi için fosfolipide bağımlı olan, fosfolipid ve kolesterol düzeyindeki değişikliklere hassas bir enzimdir⁽⁷¹⁾. Asidik fosfolipidler (FS, fosfotidilinozitol ve fosfotidik asid) enziminin etkili aktivatörüdürler. Halbuki nötral fosfolipidler (FK, sfingomyelin, FE) ya hiç etkili değildir, ya da çok az enzim aktivitesini artırırlar ya da inhibe ederler.

Sinaptozomal membran, Ca^{2+} -ATPaz'ının kalmodulinle aktiflendiği iyi bilinir⁽¹³⁰⁾. Kalmodulin intrasellüler Ca^{2+} reseptörü olan Ca^{2+} bağlayan bir proteindir.

5 μM serbest Ca^{2+} , ATPaz aktivitesini yarı maksimal uyandır. ml'de 10 mg kalmodulin varlığında yarı maksimal aktivasyon için gereken serbest Ca^{2+} konsantrasyonu 1.5 μM 'e düşer. 10 μM 'un üstünde serbest Ca^{2+} konsantrasyonları kalmodulin bulunsa da inhibitör etkilidir⁽³⁹⁾.

YAŞLANMANIN BİYOKİMYASI

Yaşlanmanın geniş kapsamlı biyolojik tanımı, yaşamdaki gelişme sürecinin geçişi ile oluşan fonksiyonel ve yapısal değişiklikler ve çevresel uyarılara karşı artan yıpranma nedeniyle de canlılığı sürdürme yeteneğinin azalması ile karakterize olgunluk sonrası dönemi olarak yapılabilir⁽¹⁰⁹⁾

Yaşlanma olayını açıklamak için birçok varsayım ileri sürülmüştür. Bunların en önemli olanları genetik ve gelişimsel (bağışıklık, nöroendokrin) varsayımlar, hatalı katabolizma, protein glikolizasyonu, somatik mutasyon gibi tahmini varsayımlar ve serbest radikal reaksiyonlarıdır⁽⁹²⁾. Genellikle tek bir varsayım kabul edilmemiştir. “Bu olağanüstü olay esrarını korumaktadır”, “Yaşlanmanın tüm mekanizmalarını tek bir varsayımın açıklayabilmesi şüphelidir” denilmektedir^(172,205). Yaşlanmanın, tüm varsayımların ortak etkisi sonucu oluşabileceği düşünülmektedir. Bununla beraber birbiriyle sıkı ilişkili olan genetik ve serbest radikal varsayımları en önemlileridir⁽⁹²⁾.

Yaşlı Memeli Organizmalarda Görülen Biyokimyasal Değişiklikler **Membran Değişiklikleri**

Yaşlanma sırasında membranın yapı ve fonksiyonlarında çeşitli değişiklikler olur:

- Membranların glikolipid ve glikoproteinlerinin karbonhidrat kalıntılarında değişiklikler olur, böylelikle membran fonksiyonları bozulur⁽²⁹⁾. Bu hücre yüzeyi karbonhidratları arasında membranla ilgili birçok temel işlevdeki rolü açısından en önemlisi sialik asiddir⁽²¹²⁾. Bundan dolayı, SA’ın membrana bağlı karbonhidrat zincirlerinin bileşimindeki küçük bir değişme bile membran fonksiyonunda önemli bir değişime yol açabilecektir. Birçok araştırmacı biyolojik membranların, membrana bağlı proteinlerinin aktivitesindeki değişikliklerle birlikte membran lipid bileşiminde yaşa bağlı değişiklikler olduğunu gözlemlemişlerdir^(21,74). Bu değişikliklerin başlıcası fosfolipid yağ asidi zincirlerinin doymamışlık derecesindeki azalma ve kolesterol miktarındaki artıştır. Böylelikle kolesterol/fosfolipid oranı artar. Bu tür değişikliklerin membran akışkanlığını azalttığı böylelikle membran

fonksiyonunu etkilediği bilinir. Lipid membranların akışkanlığı diğer birçok faktörle birlikte membran proteinlerinin bileşimi ve fonksiyonunun düzenlenmesinden sorumludur. Na^+, K^+ -ATPaz'ın fonksiyonu, çevresindeki fosfolipidlerin akışkanlığına ileri derecede bağlıdır. Kolesterol artışının transport aktivitelerini olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir^(37,147). Sıçan beyinde membrana-bağlı Na^+, K^+ -ATPaz'ın yaşlanma ile azaldığı gösterilmiştir^(11,40). Ayrıca sıçan böbreği fırçamsı kenar membranı alkali fosfataz'ı ve γ -glutamil transpeptidaz'ının yaşlanma ile azaldığı saptanmıştır⁽⁹⁴⁾.

- Yaşlanmada serbest radikal varsayımını ilk ortaya atan Harman serbest radikallerin enzimler ve diğer proteinlere karşı hücre membranları, DNA ve RNA'da ilerleyici ve gelişigüzel hasara neden olduğunu ileri sürmüştür⁽⁶⁷⁾. Günümüzdeki gözlemsel ve deneysel kanıtlar, yaşlanmanın tüm hücreler ve dokuların tamamında oluşan bütün serbest radikallerin toplamı ile ilişkili olduğunu veya en azından onun en büyük katılımcısı olduğunu göstermiştir⁽⁹²⁾. Bu reaksiyonlar, muhtemelen membranın lipid ve protein kalıntılarında çarpaz-bağlanma ilişkilerini hızlandırır ve böylelikle akışkanlığın azalışına yardımcı olur⁽⁷⁴⁾. Patolojiler, 100 yaşın üzerindeki yaşlı insanların karaciğer, kalp, iskelet kası ve beyinlerinde 'yaşlanma pigmentleri' nin (lipofuscin ve seroid) biriktiğini göstermişlerdir. Bu sarı-kahverengi fluoresan pigment, oksijen türevi serbest radikal reaksiyonlarının yan ürünüdür ve varlığı oksidan strese karşı yetersiz vücut savunmasını düşündürür⁽⁹²⁾.
- Membran akışkanlığı veya fosfolipid bileşimi, hücre membranlarından reseptörle düzenlenen bilgi transferini etkiler⁽⁶⁰⁾. Bu durum, yaşlanma ile çeşitli hormonlara karşı hassasiyetin azalmasına sebep olur. Azalmış membran akışkanlığı yaşlı organizmaların hücrelerinin osmotik direncinde artışa yol açar. Birçok dokuda çeşitli hormonların reseptörlerinin sayısında ve ilgilerinde artma veya azalma olur ya da aynı kalır. Örneğin; kalpte β -reseptör sayısında azalış, karaciğer β -reseptör sayısında artış olabilir ve lökositlerde β -reseptörlere ilgi azalır, fakat reseptör sayısı değişmez⁽⁵¹⁾. Bugüne kadar

yaşlanma ile çeşitli reseptör isotiplerinin oranları değişebilse de reseptörlerin primer yapısında hiçbir değişiklik bildirilmemiştir.

- Yaşlı hayvanlarda, membrandaki bağışıklık hücrelerindeki değişikliklere bağlı olarak bağışıklık yanıtlarında fonksiyonel azalma görülür⁽⁷⁷⁾. Bağışıklık yanıtının yaş ilerledikçe azalmasının, en iyi olmaktan çıkmasının yaşlanmanın önemli nedeni olduğunu belirten araştırmacılar da vardır. Yaş ilerledikçe vücudun kendi antijenlerine karşı ürettiği antikorlar artar, buna karşılık çevreden gelen yabancı antijenlere yanıt azalır. Kendi doku antijenlerine karşı oluşan antikorlar (oto-antikorlar) dokuların yıpranmasına yol açar. Yaşlı farelerin hücresel ve humoral bağışıklığının genç hayvanlarınkinin ancak %10-25'i kadar olduğu gösterilmiştir⁽⁶⁸⁾.

DNA İle İlgili Değişiklikler

DNA'nın primer ve tersiyer yapısına yaşın etkisi geniş çapta araştırılmıştır. Primer yapıda yaşla ilgili değişiklikler, tek kol kırıkları sıklığının artışı, DNA metilasyonunun azalışı ve telomerik DNA dizilişlerinin kaybıdır^(105,185). Tersiyer yapıda yaşla ilgili değişiklik; negatif süper kıvrılmanın kaybıdır⁽⁹¹⁾. Bu kayıp DNA replikasyonu, onarımı ve transkripsiyonu üzerine derin etkilere neden olur⁽⁹¹⁾. Yaşlanma, bölünen hücrelerde çoğalma gücünün ve DNA replikasyon yeteneğinin azalmasıyla birlikte olur.

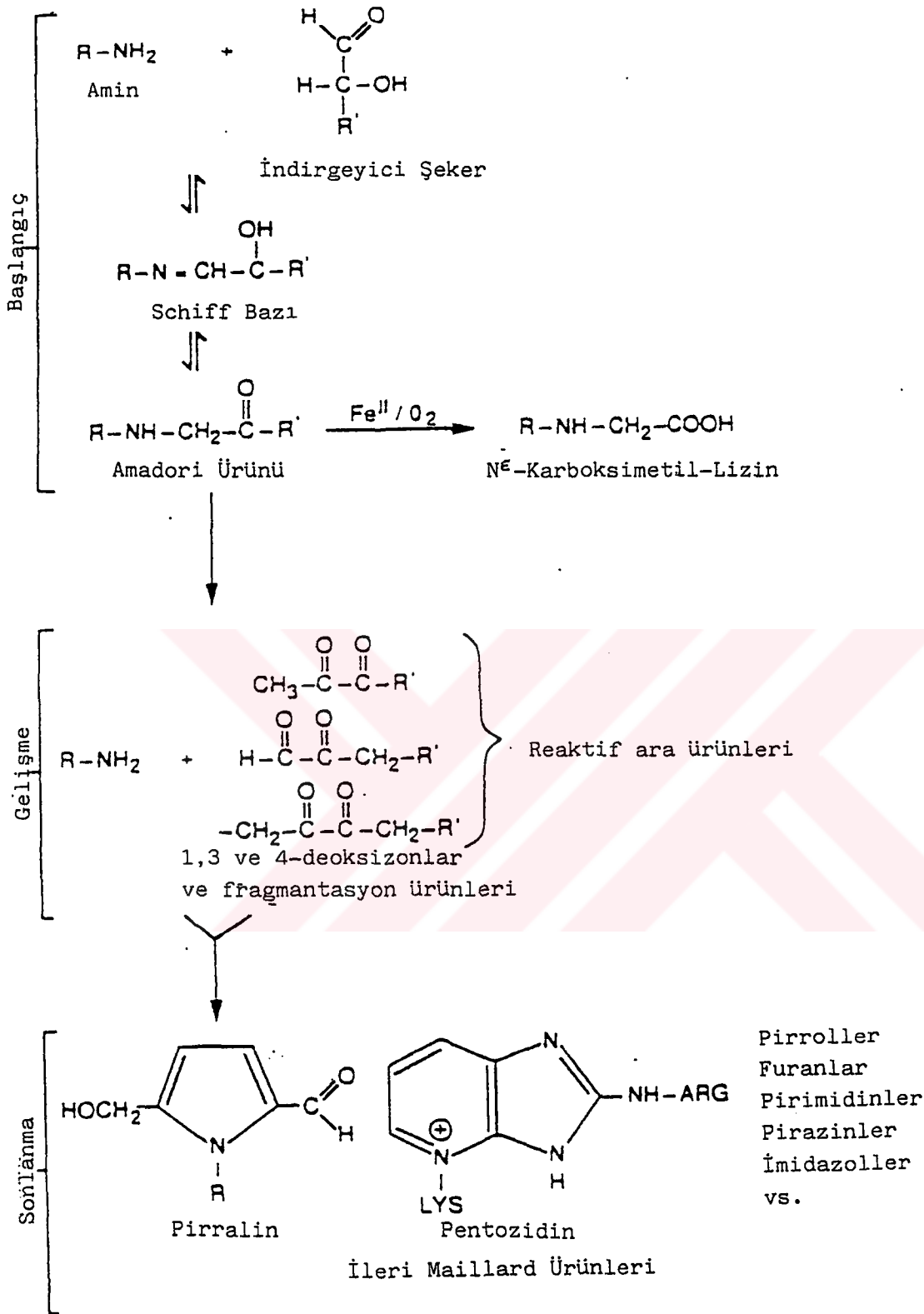
Nöronal yaşlanma ve ölümle en çok ilişkili olması muhtemel mekanizmalardan biri 'apoptosis'dir⁽⁴⁴⁾. Bu, intrensek olarak kodlanmış (yani genetik olarak) ve hücresel nekrozun aksine önceden belirlenmiş dejeneratif bir yol ile hücre ölümüne yol açan düzenlenmiş bir olaydır. Apoptosis inflamatuvar değişikliklerin olmayışı, apoptotik hücrelerde görülen büller ve sonuçta elektroforetik jellerde 'merdiven görünümü' oluşturmak üzere nükleer DNA'nın küçük parçalara segmentasyonu ile karakterizedir. Programlanmış hücresel dejenerasyon, radyasyon, gerekli büyüme faktörlerinin uzaklaştırılması ve yaşlanmanın kendisi gibi birçok farklı mekanizmalar tarafından tetiklenebilir. Apoptotik hücre ölümü, hücre ölümü dizisine yeterli derecede sebep olmak için

hücresinin hayatta kalması veya bölünmesi eğilimlerini kamçılayan veya önleyen zıt faktörler dengelendiği zaman oluşur.

Yaşlanmanın serbest radikal hipotezine göre, normal metabolizma sırasında sürekli oluşan radikaller, DNA ve diğer makromolekülleri hasara uğratarak hücrede birikir⁽¹⁰⁸⁾. Bu durum, serbest radikalleri oluşturan reaksiyonlara karşı savunma sistemlerindeki ilerleyici defektlere bağlıdır. Sonuç, dejeneratif lezyonların ortaya çıkması ve hücresel ölümdür. Buna bağlı olarak organizma yaşlanır ve ölür. Bir türün yaşam süresi potansiyeli genetik olarak belirlenir, bununla beraber beslenme gibi çevresel koşullarla değiştirilebilir⁽¹⁰⁸⁾. Örneğin, Harman birçok türün yaşam süresinin besine antioksidanların eklenmesiyle %20 kadar arttığını göstermiştir⁽⁶⁸⁾.

Ekstrasellüler Proteinlerdeki Değişiklikler

Kollajen veya kristalin gibi yapım-yıkımı (turn-over) yavaş olan ekstrasellüler proteinler, fonksiyonlarını etkileyen, yavaş gelişen değişikliğe uğrarlar ve yaşlı fenotipi oluşumuna katkıda bulunurlar. Örneğin, indirgeyici şekerler ile amino asitlerin, enzime bağlı olmayan Maillard reaksiyonu ile, stabil kahverengi pigmentlerin oluşması, kollajen ve diğer makromoleküllerin çapraz-bağlanmasına katkıda bulunur (Şekil 6). Çapraz bağlanma elastisiteyi ve makromoleküllerin diğer özelliklerini etkiler. Maillard reaksiyonu, tendonlar, lens ve yapım-yıkımı yavaş olan proteinleri bulunan diğer dokuların özelliklerindeki değişikliklere yardımcı olur⁽⁹¹⁾. Güncel biyolojik yaşlanma varsayımlarının en gözde olanlarından biri çapraz-bağlanma varsayımdır. Çeşitli kollajenöz dokularda, bir takım çapraz-bağlanma bileşikler izole edilmiş ve yapıları belirlenmiştir. Bunların çoğu iminyum bileşikleridir. Kollajenin çapraz-bağlanması, kovalent moleküller arası iminyum bağları oluşumu ile fibrillogenesis'in hemen ardından başlar. Her kollajen molekülü başına 0.1 iminyum çapraz-bağı kalıntısının, çapraz-bağlardan yoksun fibrillere girişi, kollajenazla yıkıma karşı direnci iki-üç kat artırır. Çapraz-bağ oluşumunda zamana bağlı değişiklikler, yaşlanma olayında temel faktörler olmasa da yaşlanmanın önemli bir yönünü oluşturur⁽²¹³⁾.



Şekil 6. Glukozun rol aldığı ileri glikasyon son ürünleri oluşumunun genel şeması.

Enzimlerde ve Diğer İntrasellüler Proteinlerde Değişiklikler

Yaşlanma ile anti-oksidan enzim düzeylerini karşılaştıran birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, bunların hiçbirinde yaşlanma ve anti-oksidan enzimler arasında iyi bir ilişki gösterilememiştir^(1,82). Protein sentezi hızı hepsinde olmasa da birçok memeli türü ve dokusunda yaşlanma ile azalır⁽⁹¹⁾. Örneğin, sıçan kalbinde protein sentezinin yaşla etkilenmediği görülmüştür⁽¹⁶⁾. Ayrıca tirozin hidroksilaz gibi spesifik proteinlerin sentezi artabilir, azalır ve sabit kalabilir⁽⁹¹⁾. Çeşitli izoenzimlerin göreceli aktivitelerinde gelişimin diğer fazlarında olduğu gibi yaşlanmaya bağlı değişiklikler olabilir. Örneğin, sıçan kasında yaşlanma ile gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz'ın izoenzim şekli değişir⁽⁴⁵⁾.

Beyinde Yaşla İlişkili Değişiklikler

Yaşlanma ve onun beyine etkilerinin hemen hemen kaçınılmaz olduğu kabul edilmektedir. MSS'de yaşlanma olayını açıklayabilecek çeşitli kuramsal mekanizmalar ileri sürülmüş olmasına rağmen, yaşlanmanın biyokimyasal temeli hala aydınlatılamamıştır⁽²⁰⁹⁾. Yaşlanmada beyin yapısı ve fonksiyonları etkilenir. Substantia nigra'dan hemen hemen %50 ve medial temporal bölgedekilerin belki de %25'i olmak üzere nöronlar seçimli olarak kaybolur. Hipokampustaki kayıpların derecesi tartışmalı olmasına rağmen, beyin sapındaki birçok nükleusda ileri yaşlara kadar nöronlar kalır. Serebral kortekste yaşla-ilişkili değişiklikler konusunda önceki çalışmalarda nöronal kayıpların %15 ile %35 arasında olduğu bildirilmiş ve daha sonra bilgisayarlı görüntüleme teknikleriyle büyük nöronlar arasında kayıpların %50'lere vardığı gösterilmiştir. Bu değişikliklerin nöronal hücre sayısından çok nöronal hücre büyüklüğündeki değişikliklere bağlı olduğu sanılmaktadır. Frontal ve serebral kortekste sinapsların sayısında yaşla ilişkili azalmalar olduğu bildirilmiştir⁽⁴⁴⁾.

Yaşlanma ile çoğu hipertansiyon ve ateroskleroz gibi sistemik koşullara bağlanabilen bir takım damar değişiklikleri daha sıkça rastlanır. Yaşlanmayla birlikte glial hücre aktivasyonunda, protein ve lipidlerin oksidatif hasarında, geri dönüşümsüz protein glikasyonunda ve DNA hasarında artışlar olur. İnsan sereb-

ral korteksinde oksitlenmiş protein düzeylerinin büyük çapta arttığı gösterilmiştir ve hücrelerin oksidatif hasarı sonucu biriken lipofuscin'in yaşla ilişkili morfolojik değişikliklerin en belirgin göstergesi olduğu düşünülmüştür⁽¹⁸⁴⁾. Glukoz tarafından nonenzimatik ve geri dönüşümsüz olarak değiştirilmiş doku ve hücre yüzeyi proteinleri olan ileri glikasyon son ürünlerinin yaşlanan insan beyinde biriktiği bildirilmiştir⁽¹²²⁾. Mikroglia'lar beyinde benzer fonksiyon yapabilirler ve mikroglia'ların glikozillenmiş proteinlerle aktivasyonu yaşla ilişkili mikroglial değişiklikleri hızlandırabilir⁽¹²¹⁾. Bu tür değişiklikler, kısmen Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi yaşla ilişkili artan dejeneratif hastalıkların oluşumunun temelini oluşturabilir.

Membran fosfolipidlerinde yaşla ilişkili olarak sitidin difosfokolin yoluyla FE ve FK sentezi hızında azalma, buna karşılık FE'ün enzimatik metilasyonu yolunda FK sentezinde artma olduğu sanılıyor. Bu nedenle fosfolipid metabolizması, fosfolipid içeriği ve protein, kolesterol gibi diğer membran bileşiklerinde yaşla ilişkili değişiklikler membran akışkanlığı, membrana bağlı enzim aktiviteleri, reseptör mobilitesi, uyarılabilirlik ve biyolojik haberlerin geçirilişi gibi membran özelliklerinde değişikliklerle sonuçlanabilir⁽²¹⁾. Bu konuda yapılan az sayıdaki çalışmalarda sinaptosomal membran Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesinde ve sıçan serebral korteksinde enerji gerektiren mitokondri dışı sinaptik ATPaz'ların spesifik aktivitelerinde yaşlanma ile belirgin azalmalar olduğu bildirilmiştir^(11,21,214). Yaşlanma ile membranda biyokimyasal ve fonksiyonel değişiklikler ve DNA hasarına sebep olan reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve salıverilişinde bir artış olur⁽¹²⁾. Anti-oksidan enzimler beyinde düşük aktivitede olduklarından ve kolaylıkla peroksida olabilen yüksek çok doymamış yağ asitleri içeriğinden dolayı, beyin oksidan strese karşı ileri derecede duyarlı olduğu varsayılır⁽³⁶⁾. Beyinde yaşlanma ve antioksidan savunma sistemlerinin karmaşık olduğu düşünülmüştür. Bu konudaki değişik bulgular yüzünden beyinde oksidan strese karşı savunma mekanizmaları ve yaş arasındaki ilişki açıklanamamıştır⁽⁸²⁾.

Yaşlanmış beyin en azından optimal koşullarda kompensatuvar mekanizmalara bağlı olarak tamamiyle iyi fonksiyon yapabilir. Sinir hücresi

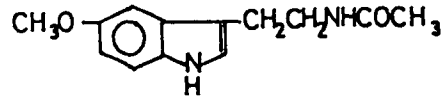
kaybının tek sonucu stresli koşullar altında yaşla ilişkili olduğu iyi bilinen delirium'a eğilim gibi ortaya çıkan rezerv kapasitedeki azalmadır.

Beyin kolin asetiltransferaz düzeyleri ve muskarinik bağlanma yaş ilerledikçe azalır. Hafıza kaybı gerçekte normal yaşlanma sırasında bir dereceye kadar oluşabilen sıklıkla kolinerjik fonksiyonda azalma ile birlikte görülür^(25,110). Strial dopamin tutulum bölgeleri düzeylerinde dopamin taşıyıcıları ve dopamin düzeylerinde yaşla ilişkili azalmalar görülür⁽¹²¹⁾. Serotonerjik sistemler kortikal serotonin bağlanma bölgeleri düzeylerinde yaşla ilişkili azalma gösterirler. Adrenerjik sistemler serebral kortikal α_2 ve β_1 adreno reseptörlerde yaşla ilişkili azalma olur ve korteksin GABA-erjik innervasyonunun yaşlanma ile azaldığı sanılmaktadır⁽¹²¹⁾.



MELATONİN

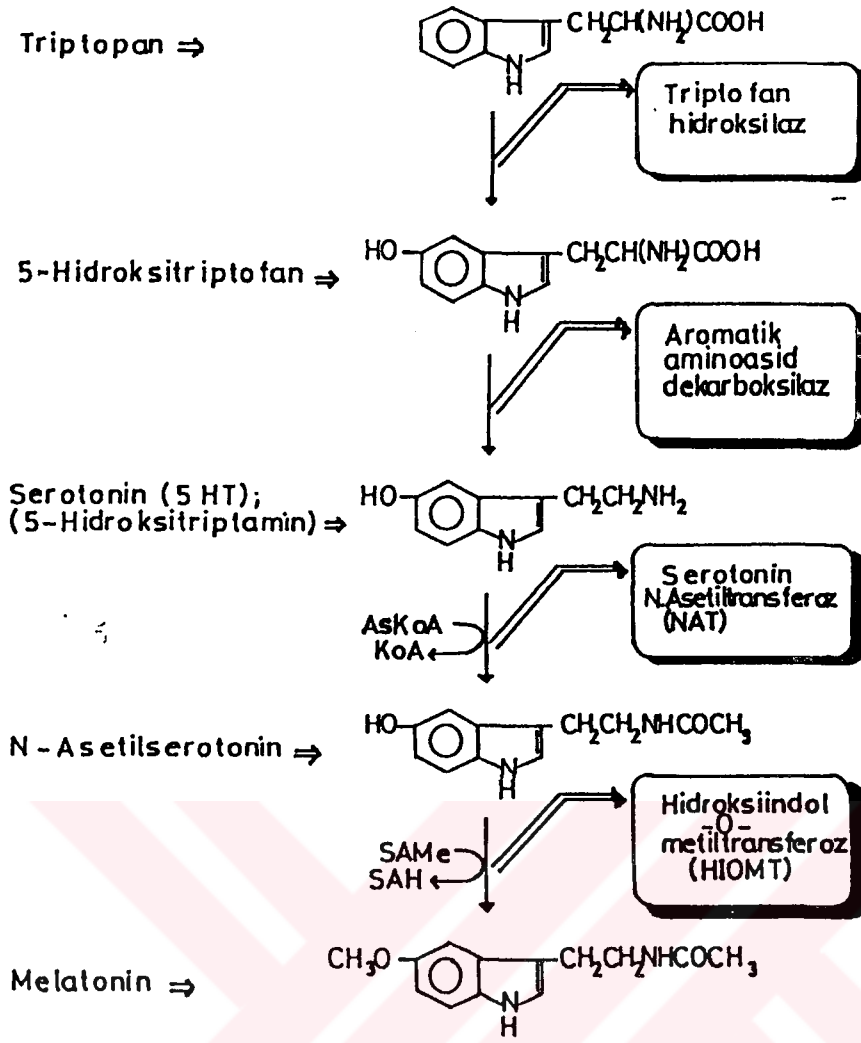
1950'lerin sonunda Lerner ve arkadaşları pineal bezden çok düşük dozlarda amfibilerin derisini açan bir madde elde ettiler⁽⁹⁸⁾. Yunanca melas= karanlık ve tonein= baskılama kelimelerinden oluşan (MLT) adını verdikleri bu maddenin kimyasal yapısının 5-metoksi-n-asetil-triptamin olduğunu gösterdiler ve MLT'in bazı hastalıklarda insanlarda oluşan düzensiz deri pigmentasyonlarının tedavisinde kullanılabileceğini düşündüler⁽⁹⁸⁾.



MLT'in memeli olmayan omurgalılarda dermal melanoforlarla ilişkisi iyice belirlendiği halde, insanlarda böyle bir etkisinin verimli olmadığı ileri sürülmüştür.

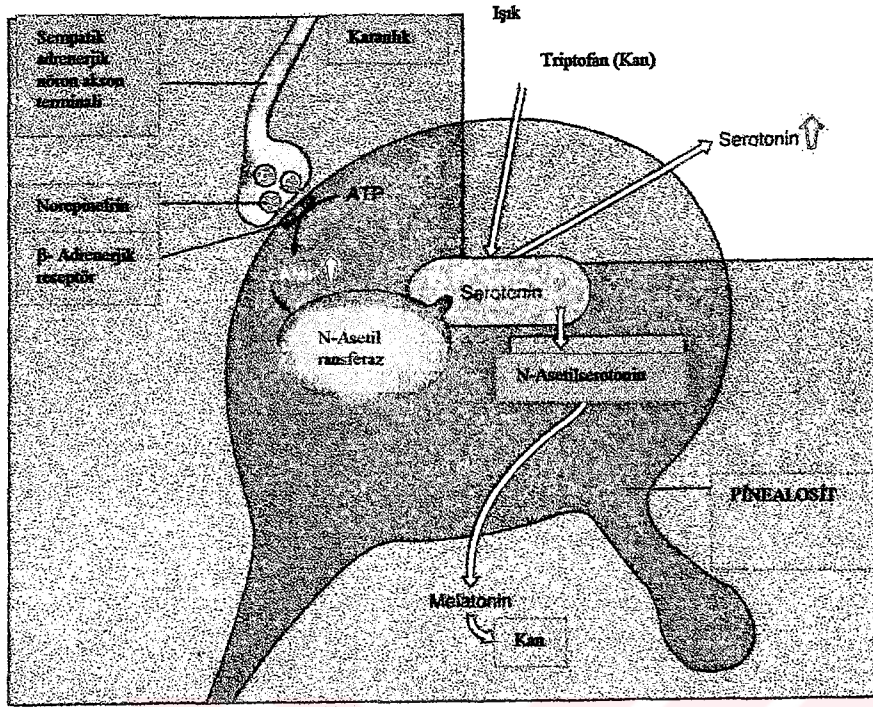
MELATONİN SENTEZİ, SALGILANIMI VE DAĞILIMI

Pineal hormon olan MLT sentezi adrenerjik kontrol altındadır. MLT pinealositlerde ve bağırsağın enterokromaffin hücreleri⁽⁸¹⁾, trombositlerde⁽¹⁰³⁾, periferik mononükleer kan hücreleri⁽⁵³⁾ gibi diğer çeşitli hücrelerde triptofandan serotonin yoluyla sentezlenir. MLT sentezinde ilk basamak sistemik dolaşımdan pinealosit içerisine triptofanın aktif alımıdır⁽¹⁹¹⁾. Triptofan-5 hidroksillendikten sonra dekarboksilasyona uğrayarak serotonine dönüşür. Serotonin, N-asetiltransferaz (NAT) ve hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT)'ın ardışık aktiviteleri ile MLT'ne dönüşür (Şekil 7).



Şekil 7.

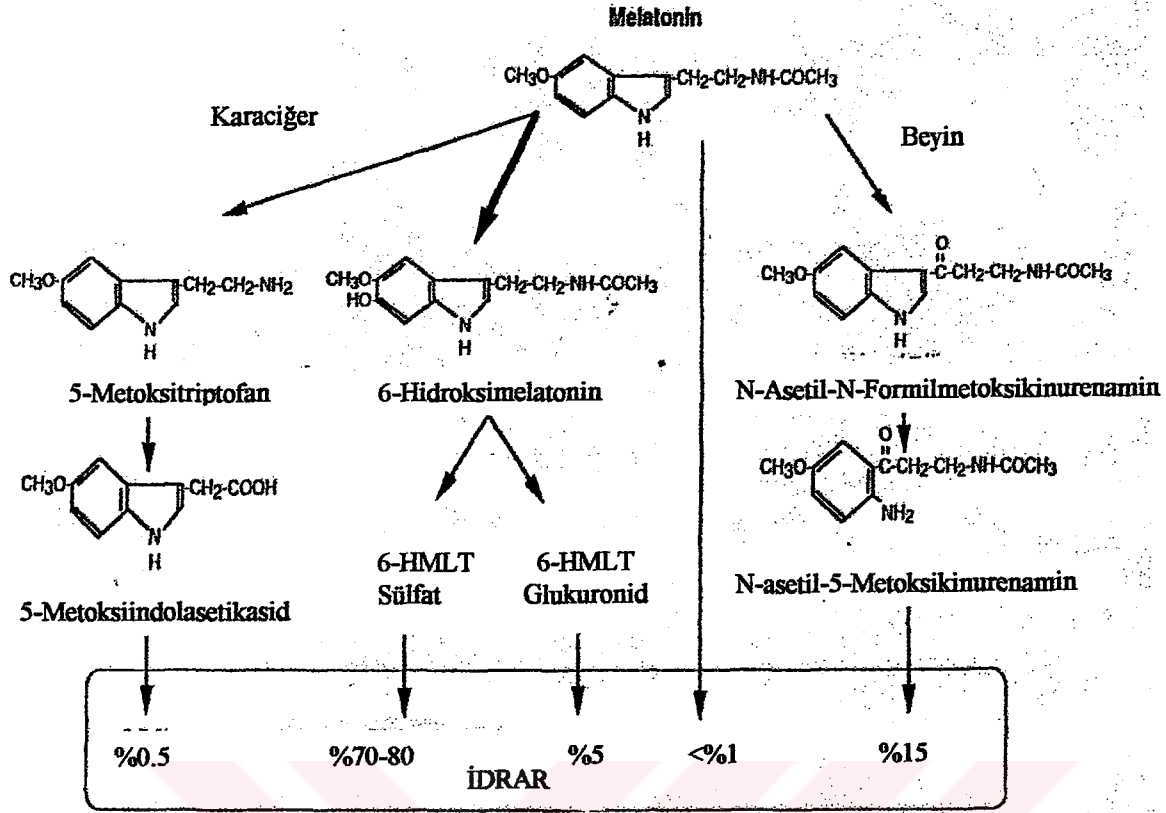
Pineal bezde MLT sentezi ve dolaşıma salgılanması ışık, karanlık siklusunun etkisi altında düzenlenir (Şekil 8,10). Işığın pineal aktiviteyi inhibe etmesi nedeniyle gün boyunca MLT düzeyleri düşük, gece ise yüksektir. Pineal bez ışıktan gelen uyarının kimyasal haberciye dönüştüğü bölgedir. Bu uyarı retinohipotalamik bölge, suprakiazmatik nukleus (SKN) ve periferel sempatik sinir sistemindeki üst servikal ganglionların (ÜSG) pre- ve postgangliyonik liflerini içeren nöral yolla göz içinden nakledilir⁽¹⁵²⁾. SKN 24 saatten biraz daha fazla (25 saat civarında) periodisiteye sahip pineal MLT sentez ritmini oluşturan endojen sirkadyan bir saat de içerir⁽⁴⁸⁾. MLT'in sadece küçük miktarı gün esnasında üretilir. Saat 21.00'de salgılanma başlar, 23.00'e kadar artar ve maksimum tepe noktası 02.00 civarındadır⁽¹⁷⁵⁾. Yaşlanma ile MLT'in tepe noktasının normalden yaklaşık 1 saat sonra oluştuğu, maksimum tepe noktasının



Şekil 8. Retinadan gelen Işık/karanlık sinyalleri sempatik liflerle pinealosite nakledilir. Burada MLT sentezindeki anahtar enzim olan NAT'ın kontrolü β- Adrenerjik reseptörler yoluyla olur.⁽¹²⁷⁾

genç erişkinlerin yalnızca %50'si kadar olduğu gösterilmiştir⁽²⁰⁶⁾. Karanlığın başlaması sinir uçlarından norepinefrin salıverilişini tetikler ve β_1 reseptörlerine noradrenerjik uyarı cAMP birikimine sebep olur, böylece MLT sentezi başlar. MLT sentezi Ca^{2+} -fosfolipid bağlı protein kinaz C yoluyla cAMP yolunu arttıran fosfoinozitol sistemiyle bağlantılı α -1 adrenoseptörler tarafından arttırılır. Pinealositlerde yeni sentezlenen MLT kana pasif olarak salgılanır⁽²⁴⁾. MLT'in kandaki yarı ömrü kısa olup 10-40 dakika civarındadır (insanda 28.4 dakikadır)⁽¹⁵²⁾. Dolaşımdaki MLT, beyin dahil tüm vücut dokularına girebilir. MLT'in en azından hayvanlarda korteksin ve beynin diğer bölgelerinde (serebellum, pons, hipotalamusun para ventriküller nükleusları) yoğunlaştığı bildirilmiştir⁽²⁰⁾.

Hormonun %90'i karaciğerde 6-hidroksimelatonine (6-HMLT)'e hidrok-sillendirilir ve kandan tüm vücut sıvılarına hızla geçirilir⁽¹⁵²⁾. 6-HMLT sonra %60-70'i sülfat (S) ve %20-30 glukuronid şeklinde konjuge olur. MLT'in küçük bir kısmı beyinde N-asetil-5-metoksikinurenamin'e dönüştürülür⁽¹⁶⁸⁾ (Şekil 9).

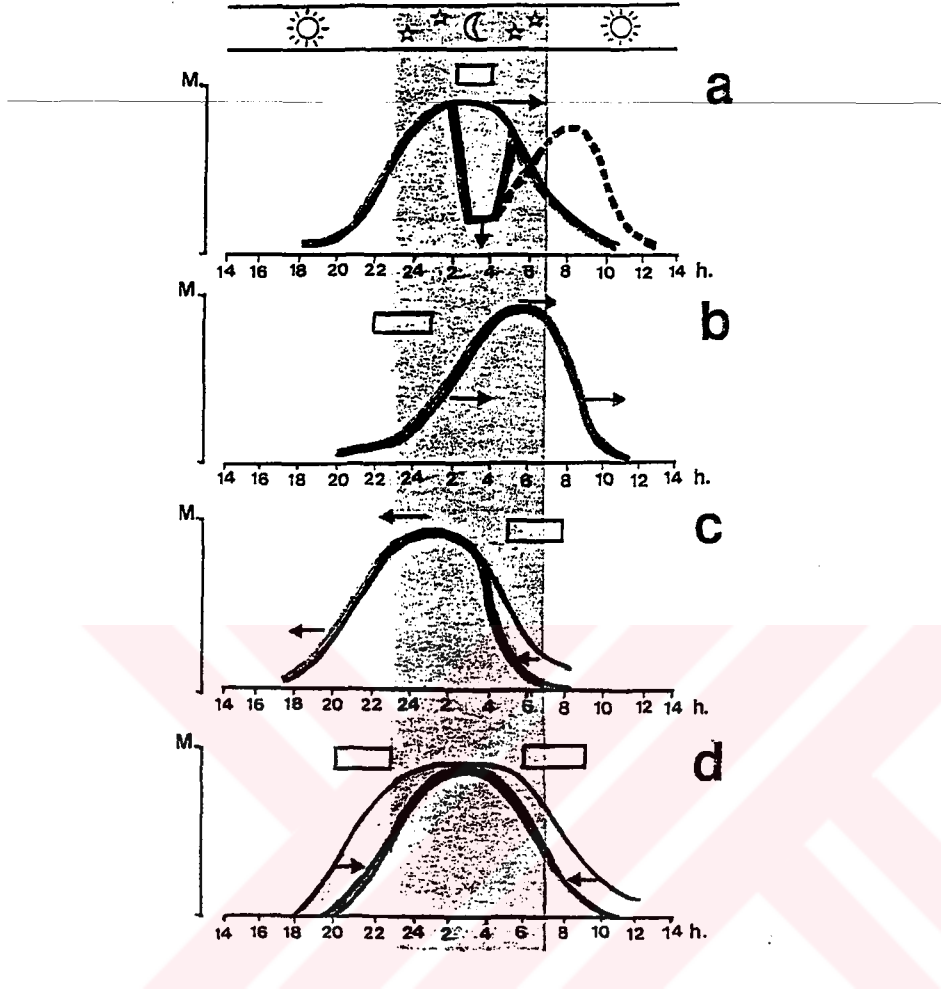


Şekil 9. MLT'in hepatik ve serebral katabolizması⁽²⁰¹⁾

Atılım idrarla (%70) ve dışkı ile (%20) olmak üzere 6-HMLT ve kinurenaminlerin glukuro- ve sülfobileşikleride şeklinde olur. Serbest MLT ve 5-metoksiindolasetik asid sırasıyla %1'den ve %0.5'den az olacak şekilde idrarla atılır⁽²⁰¹⁾. Konjuge 6-hidroksimelatonin(6-sülfotoksimeletonin)'in 24 saatlik idrar atılımı 24 saatlik plazma melatonin profili ile uyumludur. Böylece normal kişilerde pineal fonksiyonun ölçülmesi için invaziv olmayan bir yöntem sağlanabilir. Bununla beraber karaciğer fonksiyon bozukluğu olan kişilerde plazma MLT klirens hızı çok azdır.

Normal MLT salgılanımının gündüz serum konsantrasyonu çok düşük olup 10 pg/ml kadardır ve gece düzeyleri 30-120 pg/ml arasında değişir. Tükrük MLT düzeyleri plazmadaki miktarlarının %27-32'si arasındadır^(168,217). Salgılanma şekilleri mevsimsel değişiklikler gösterir ve kışın akşam salgılanan MLT düzeyindeki artış, yazın ise buna oranla yaklaşık 1.5 saatlik gecikmeyle olur⁽¹⁶⁸⁾. Dolaşımdaki MLT'e gastrointestinal bölge katılımları büyük bir olasılıkla besin alımı (triptofan sağlanması) ve besinsel durum ile etkilenir⁽⁸¹⁾.

Herhangi bir depolanım yeri olmadığından, dolaşımdaki MLT düzeyleri aslında pineal aktiviteye paraleldir.



Şekil 10. Parlak ışık MLT salgılanımına etkileri: Işık gece yarısı bir kez verildiğinde salgılanma inhibe olur; tekrarlayan verilisten sonra faz gecikmesi olur (a). Plazma MLT profili ışık uygulanış zamanına göre gecikmiş-faz (b), öne alınmış-faz (c) veya daha daralmış (d) olarak görülür⁽³⁴⁾.

MELATONİNİN HEDEFLERİ ve RESEPTÖRLERİ

MLT büyük oranda lipofilik olması nedeniyle hem hücre içindeki hem de hücre dışındaki hedeflere bağlanabilir. Beyin, MLT etkisinin başlıca hedef organı olarak düşünülmektedir⁽¹⁰¹⁾. MLT'in başlıca insan dışı birçok türün hipofizer pars tuberalisine, insan dahil birçok hayvansal organizmanın hipofizer pars distalisine ve birçok hayvanın hipotalamik SKN'una bağlanır. Ayrıca kemiricilerin meme dokusu, kuşların ovaryum ve testisleri, insan spermatozoidleri ve granuloza hücreleri gibi üreme organlarında da bağlandığı saptanmıştır⁽¹⁹⁾.

İnsan MLT reseptörünü şifreleyen cDNA'nın klonlanması son yıllarda bildirilmiştir⁽¹⁶²⁾. Bu reseptör, diğer bilinen reseptörlerle küçük ardışık homoloji gösteren G-protein bağlı reseptörlerin yeni alt ailesinin bir üyesidir. Şimdiki kanıtlara göre MLT'in birden fazla etki yeri vardır. MLT-1 bağlanma bölgesi, 2-[I¹²⁵] MLT'i yüksek ilgi ile bağlar ve doyurulabilir olduğu gibi reversibldir. MLT-2 bağlanma bölgesi, 2-[I¹²⁵] MLT'i düşük ilgiyle bağlar ve hızlı birleşme ve çözünme kinetiklerine sahiptir. MLT-1 reseptörleri mevsimsel üreme, sirkadyan ritimler ve retina fonksiyonlarının düzenlenmesiyle ilgilidir. Bu reseptörlerin iki alt tipi hipofizer pars tuberalis ve SKN (MLT-1a) retina ve diğer MSS bölgelerinde (MLT-1b) yerleşmiştir⁽¹⁶²⁾. Periferik olarak bağışık hücrelerde MLT'in membran reseptörleri de bildirilmiştir⁽¹³⁸⁾. Bugüne kadar tarif edilen membran reseptörlerinin çoğunun intrasellüler 2.habercisi cAMP'dir.

Son zamanlarda MLT'in MSS dahil birçok bölgede nuklear reseptörleri de ortaya çıkarılmıştır⁽¹⁴⁵⁾. MLT'in reseptörlerle düzenlenen birçok etkilerinin yanı sıra reseptör bağımsız etkileri de vardır. MLT'in ileri derecede yayılabilme gücü nedeniyle hücrelere kolaylıkla girerek buralarda kalmoduline bağlandığı, böylelikle Ca²⁺ ile ilişkili büyük sayıda intrasellüler olayları etkilediği sanılmaktadır⁽⁸⁰⁾.

MELATONİN'İN FİZYOLOJİK ÖNEMİ

MLT'in kanser, kalp hastalığı, Alzheimer hastalığı, diabetes, katarakt, AIDS, depresyon, şizofreni vb. hastalıklardan koruyucu veya tedavi edici etkileri olduğu iddia edildiğinden son zamanlarda her derde deva imiş gibi ilgi toplamaktadır⁽²⁷⁾. Ancak düşünülen bu etkileri destekleyici en ufak bir bilgi yoktur⁽⁴⁸⁾. Hatta son 10 yıl içinde MLT'in sedatif hipnotik etkisinin çelişkili olduğu gösterilmiştir. Önceki çalışmalarda gün boyu MLT verilisinin yorgunluk ve uyku yapıcı (soporifik) etkileri olduğu bildirilmiştir, daha sonra kullanılan dozlardan daha düşük dozlarıyla bu doğrulanmıştır⁽³⁸⁾. MLT, vucüt ısını düşürdüğünden ve uyanıklığı azaltıp uyku isteğini arttırdığından ısı düzenleyici mekanizmalar yoluyla etki eden hipnotik bir hormon olarak kabul edilebilmektedir^(38,48). Sirkadyan oluşumu nedeniyle bir ritm göstergesidir, bu

yüzden belirli bir düzene sokucu önemi olduğu (faz ilerletici) sanılmaktadır⁽²⁷⁾. MLT'in jet-lag ile ilişkili semptomları (uzun mesafe uçak yolculuğu ile ilgili objektif ve subjektif sendromları) hafiflettiği bulunmuştur⁽⁷⁾. 1972'lerde pineal bezin üreme yeteneğinde mevsimsel değişen fotoperiyodlar ve yıllık dalgalanmalarla ilgili rolü ortaya atılmıştır^(30,148). Daha sonra bu çalışmalar, MLT'in kontraseptif gücüne dayanan testlerin temelini oluşturmuştur. Bugün pineal bezin MLT'in hormon yoluyla fotoperiyodik düzenlenen endokrin olayları kontrol ettiği geniş çapta kabul edilmektedir^(131,157).

İnsan ve hayvanlarda antitümör etkileriyle ilgili araştırmalara dayanarak bu hormonun endokrin bir immuno-modulator olabileceği ileri sürülmüştür^(17,99). Son çalışmalara göre MLT'in dolaylı ve dolaysız yollarla çeşitli düzeylerde immun hücreleri etkilediği ve endokrin rolüne ek olarak bağışıklık sisteminde parakrin, otokrin veya intrasellüler modulator olarak fizyolojik bir etkiye sahip olabileceği umulmaktadır^(10,99,100,216).

Son zamanlarda MLT'in güçlü bir hücre içi hidrosil radikal tutucusu olarak etki edebildiği ve hücre nukleusunda birikebildiği ve makromolekülleri oksidatif hasara karşı koruduğu ileri sürülmüştür^(154,157,161). Oksidatif hasara karşı MLT'in koruma yeteneğinin onun radikal tutucu aktivitesine kısmen bağlı olabileceği ve kan-beyin engelini kolaylıkla geçebildiğinden oksijen toksitesine karşı sinirsel koruma sağlayabileceği ileri sürülmektedir⁽¹¹¹⁾. MLT'in hücre membranlarını, oksidatif hücumu karşı daha dirençli yapmak yoluyla stabilize ettiği bildirilmiştir⁽¹⁶⁰⁾. MLT'in antioksidan aktivitesini destekleyen birçok in vitro ve in vivo çalışma vardır^(111,154,176,177). MLT, antioksidan etkisine yardımcı olan yaygın bir intrasellüler dağılım gösterir⁽¹⁵⁸⁾. MLT'in reseptörden bağımsız bir fonksiyonla antioksidan etkili olmasına karşı bazı indollerin antioksidan aktivitesi antioksidatif enzimleri uyarır^(66,136). MLT'in konsantrasyona bağlı olarak hem antioksidan hem de prooksidan aktiviteli olabileceği düşünülmüştür⁽¹¹⁸⁾. Düşük konsantrasyonlarda MLT'in antioksidan aktivite gösterdiği, yüksek konsantrasyonlarda indolün ise serbest radikalleri oluşturduğu bildirilmiştir⁽⁸³⁾.

MLT'in antioksidan aktivitesi dışında ortaya çıkarılan diğer bir etkisi ise nükleer reseptörlerle etkileşimi yani genomik ifadenin düzenlenmesine dayanır⁽³⁾.

MELATONİN İLE YAŞLANMA İLİŞKİSİ

Yaşlanmış hayvanlarda pineal fonksiyonlardaki azalma MLT'in yaşlanmada rolü olabileceğini düşündürmüştür. 2 aylık ve 10 aylık dişi ve erkek Suriye hamsterlerinde MLT siklusu incelendiğinde, pineal MLT'de geceleyin yükselmenin 2 aylık hayvanlarda görülen güçlü sıklüse kıyasla yaşlı hayvanlarda zorlukla saptanabildiği gösterilmiştir⁽¹⁴⁹⁾. Pineal bezin, MLT'de belirgin gece yükselişini oluşturma yeteneğindeki yaşla ilişkili bu azalma sıçan⁽¹⁵⁰⁾, gerbil⁽¹⁴⁹⁾ ve insanda^(84,200) çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Araştırılan türlerin hepsinde pineal bezin MLT yapımının erişkinliğe varmadan önce gittikçe düştüğü görülmüştür. İnsanlarda pubertenin başlamasıyla birlikte MLT'in düzeyleri de azalmaya başlar⁽¹⁵⁹⁾. En yüksek nokturnal kan düzeylerinin 1 ile 3 yaşları arasında olduğu bildirilmiştir. Geri kalan çocukluk sırasında nokturnal üst düzeyler sürekli olarak %80 kadar azalır. Erişkinlerde özellikle yaşlılık sırasında %10 kadar daha azalır⁽²⁰⁸⁾. Postmortem yapılan çok yeni bir çalışmada 80 yaşın üstündeki yaşlı kişilerin serebrospinal sıvısında MLT düzeylerinin, 40-80 yaş arasındaki kişilerinkinin yarısı kadar olduğu gösterilmiştir⁽¹⁰¹⁾. MLT'in sirkadyen yapımında yaşla ilişkili baskılanmanın muhtemelen pinealosit membranındaki β -reseptörlerin sayısındaki azalma sonucu⁽⁷⁵⁾ ve belki de hormonun sirkadyen ritminin olduğu SKN'daki dejeneratif değişikliklere bağlı olabileceği düşünülmüştür⁽¹³⁵⁾. Bazı araştırmacılara göre puberteyi içine alan 3-4 yıllık süre içinde MLT'indeki geceleyin yükselmenin düşmesi bu araştırmacılara gonadal olgunluğun total MLT yapımındaki azalma ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür⁽²⁰⁷⁾. Erişkinlikte nokturnal MLT düzeyleri yavaş yavaş azalmaya devam ederken yaşlı kişilerde pineal MLT yapımında ve serum düzeylerinde nokturnal bir artışın total olarak olmadığı bildirilmiştir⁽²⁰⁰⁾.

Yaşlanma ile MLT azalmasında çeşitli mekanizmaların rolü olduğu ileri sürülmektedir. SKN düzeyinde günlük MLT ritminin amplitütünü etkileyen değişiklikler, pineal hücrelerin sayısında sürekli azalma ve MLT yapımında rol

alan enzimlerin aktivitesindeki azalma bunların arasında gösterilebilir⁽¹¹⁵⁾. Son yıllarda bazı araştırmacılar MLT'i, güçlü serbest radikal tutucu etkisi ve DNA koruyucu yeteneğinden⁽¹⁵⁸⁾ dolayı kuramsal olarak yaşlanma-karşıtı hormon gibi tarif etmişlerdir⁽¹³²⁾. MLT'in yararlı bir ajan olarak gücü konusundaki çalışmalar devam etmesine rağmen, bugüne kadar insanlarda yaşlanma olaylarıyla ilgili çok yeni iki çalışma^(140,217) dışında MLT'in araştırıldığı başka çalışmalar bildirilmemiştir, bu yüzden de MLT'in uzun ömürlülükle özgün ilişkisi aydınlatılamamıştır.



MATERYAL VE METODLAR

A.MATERYAL

1. Deney Grupları

Çalışmamızda İ.Ü. Veterinerlik Fakültesi ve DETAE'den sağlanan 20 kadar dişi ve erkek sıçanlardan Anabilim dalımızda çiftleştirilerek elde edilen her iki cins Wistar-Albino sıçanlar önce yaşlarına göre gruplandırılarak dört ayrı kafeste bakıldı. Sıçanlar İstanbul Yem Sanayii'den sağlanan sıçan yemi ve su ile istekleri doğrultusunda beslendi. **4-6 hafta** bakılan 26 adet sıçan **genç**, **10 hafta** bakılan 25 adet sıçan **genç erişkin**, **8-12 ay** bakılan 30 adet sıçan **olgun erişkin** ve **20-24 ay** bakılan 20 adet sıçan **yaşlı** grubu oluşturdu. Buna göre çalışmamızda toplam 101 adet dişi ve erkek W-Albino sıçan kullanıldı. Deneyler sırasında 12 saat aydınlık:12 saat karanlık koşuluna ve ortamın oda ısısında sabit tutulmasına olabildiğince dikkat edildi.

Her bir yaş grubundaki deney grubu sıçanlara kg vücut ağırlığı başına 2 mg MLT 21 gün süreyle (genç gruba 15 gün) i.p. olarak uygulandı. Her yaş grubuna uygun kontrollerine de, MLT'in çözündüğü alkollü serum fizyolojik enjekte edilen MLT miktarında verildi.

2. Kimyasal Maddeler

2.1. Melatonin'in Hazırlanması

10 mg MLT (Sigma) 100 µl absolu etanol içerisinde çözündüğü 430 mM'lık ana solüsyon hazırlandı. %0.9 NaCl ile konsantrasyonu 2.4 mM olacak

şekilde sulandırıldı. Vücut ağırlığı (kg) başına günlük 2 mg, i.p. MLT'e eşdeğer olacak şekilde hazırlanarak uygulandı. (Taze olarak hazırlandı).

2.2. Ham S.P.M. Homojenatı Eldesinde Kullanılan Madde ve Ayırıcılar

- a. 50 mM İmidazol Tamponu (pH 7.2) (Doku Homojenizasyonu İçin): 0.851 g. imidazol (Sigma), 0.06 g. Tris (Sigma), 0.186 g. EDTA (Sigma), 23.1 g. sukroz (Sigma) bir miktar bidistile suda çözülüp sonra 0.1 N HCl ile pH 7.2'ye pH-metreyle ayarlandı ve 250 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.
- b. 10 mM İmidazol Tamponu (pH 7.2) (Ham Sinaptozomal döküntünün Yıkınması İçin): 0.17 g. imidazol, 0.03 g. Tris, 0.095 g. EDTA bir miktar bidistile suda çözülüp sonra 0.1 N HCl ile pH 7.2'ye pH-metreyle ayarlandı ve 250 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.
- c. 50 mM Tris-HCl Tamponu (pH 7.4): 0.2 M stok Tris çözeltisinden 50 ml alınıp 0.2 N HCl ile pH 7.4'e ayarlandı ve 200 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.

0.2 M Tris: 12.15 g. Tris 500 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.

0.2 N HCl: 4.2 ml derişik HCL (12.1 N) 250 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.

0.1 N HCl: 0.83 ml derişik HCL (12.1 N) 100 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.

2.3. Ham S.P.M. 'da Na^+, K^+ ATPaz İncelenmesinde Kullanılan Madde ve Ayırıcılar

2.3.1. Stok Tampon Çözeltileri

100 mM İmidazol : 0.6808 g. imidazol 100 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.

100 mM glisil-glisin: 1.321 g. glisil-glisin 100 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.

100mM MgCl₂ : 0.5082 g. MgCl₂ 25 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.

- a. **Total ATPaz karışımı (ortam A):** Stok 100 mM imidazol'den 30 ml (30 mM), glisil-glisin'den 30 ml (30 mM), MgCl₂'den 3 ml (3mM) alındı. Bu karışım içinde 0.701 g. NaCl ve 0.037 g. KCl çözüldü ve 2 N HCl ile pH 7.4'e ayarlandı. 100 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.
- b. **Ouabain'e dirençli ATPaz karışımı (ortam B):** İçinde stok imidazolden 30 ml (30 mM), glisil-glisin'den 30 ml (30 mM), MgCl₂'den 3 ml (3mM) bulunan karışıma 0.073 g. ouabain eklendi. pH 7.4'e 2 N HCl ile ayarlandıktan sonra toplam hacim 100 ml'ye bidistile su ile tamamlandı
- c. **78 mM ATP.Na₂ substratı:** 0.0858 g. ATP.Na₂ (Sigma) 2 ml bidistile suda çözüldü. Böylece 1.3 ml'deki son konsantrasyonu 3 mM oldu.(Taze hazırlandı)
- d. **1.2 M HClO₄:** İçerisinde bir miktar bidistile su bulunan 100 ml'lik balon jojeye 100.46 M'lık HClO₄'ten 13.12 ml konuldu ve toplam hacim 100 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.

2.4. Ham S.P.M.'da Ca²⁺ ATPaz İncelenmesinde Kullanılan Madde ve Ayırıcılar

2.4.1. Stok Tampon Çözeltileri

500 mM İmidazol-HCl Tamponu (pH 7.5): 3.404 g. imidazol bir miktar bidistile su ile çözüldükten sonra 2 N HCl ile pH 7.5'e ayarlandı ve hacim 100 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.

100 mM CaCl₂: 0.555 g. CaCl₂ 50 ml bidistile suda çözüldü.

100 mM MgCl₂: 0.5082 g. MgCl₂ 25 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.

- a. **Total ATPaz karışımı (ortam A):** Stok imidazol-HCl'den 27 ml (135 mM), MgCl₂'den 5 ml (5 mM) ve CaCl₂'den 0.05 ml (0.05 mM) alındı ve 100 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.

- b. ***Mg²⁺ ATPaz karışımı (ortam B):*** Stok imidazol-HCl'den 27 ml (135 mM), MgCl₂'den 5 ml (5 mM), az miktarda sıcak bidistile su içerisinde çözünmüş 0.01904 g. EGTA (0.5 mM) ile karıştırıldıktan sonra son hacim bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- e. ***120 mM ATP.Na₂ substratı:*** 0.1326 g. ATP.Na₂ 2 ml bidistile suda çözüldü. Böylece 1.5 ml'deki son konsantrasyonu 4 mM oldu (Taze hazırlandı)
- c. ***%50 TCA (Triklorasetikasid)***

2.5. İnorganik Fosfor İncelenmesinde Kullanılan Kimyasal Madde ve Ayıraçlar

- a. ***Stok fosfat standartı (0.1333 mg/ml fosfor):*** Önceden desikatörde kurutulmuş KH₂PO₄'tan 0.05853 g. 100 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.
- b. ***Sulandırılmış fosfat standartı:*** 0.01333 mg/ml olacak şekilde sulandırıldı.(Taze hazırlandı)
- c. ***%10 Amonyum molibdat (Sigma):*** 10 N HCl içerisinde.
- d. ***Renk ayırıcı:*** 500 mg FeSO₄, 1 ml %10 amonyum molibdat, 9 ml bidistile suda çözüldü. (Taze hazırlandı)

2.6. Ham S.P.M.'de AChE İncelenmesinde Kullanılan Kimyasal Madde ve Ayıraçlar

2.6.1. Stok Fosfat Tamponları

0.1 M Na₂HPO₄(anhidröz): 3.55 g. Na₂HPO₄ bidistile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

0.1 M KH₂PO₄: 3.4025 g. KH₂PO₄ bidistile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

- a. ***0.1 M fosfat tamponu pH 7.00:*** 0.1 M Na₂HPO₄'den $\cong$ 61.1 ml ve 0.1 KH₂PO₄'den $\cong$ 38.9 ml karıştırılarak hazırlandı.
- b. ***0.1 M fosfat tamponu pH 8.00:*** 0.1 M Na₂HPO₄'den $\cong$ 94.6 ml ve 0.1 KH₂PO₄'den $\cong$ 5.4 ml karıştırılarak hazırlandı.

- c. **0.75 M asetiltiokolin iyodid:** 21.67 mg. Asetiltiokolin iyodid (Sigma) bidistile su ile 1 ml'ye tamamlandı. (Buzdolabında korunursa 10-15 gün dayanıklıdır.)
- d. **0.01 M Ditiobisnitrobenzoik asid (DTNB):** 39.6 mg 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoik asid (Sigma) ve 15 mg NaHCO₃ pH 7.00'lik fosfat tamponu ile 10 ml'ye tamamlandı.

2.7. Ham S.P.M.'de Sialik Asid Düzeyinin İncelenmesinde Kullanılan Kimyasal Madde ve Ayıraçlar

- a. **0.025 M Periodik asid:** 0.56 g. periodik asid 0.25 M HCl ile 100 ml'ye tamamlandı.
- b. **0.1 M H₂SO₄:** İçerisinde bir miktar bidistile su bulunan 100 ml'lik balon jojeye 0.54 ml derişik H₂SO₄'den alındı ve bidistile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- c. **Sodyumtiosülfat (Na₂S₂O₃):** %5 (ağırlık /hacim = ağ /h) (Sigma).
- d. **0.1 M 2-Tiobarbiturik asid (TBA):** 0.288 g. TBA (Sigma), 1 N NaOH ile pH 5.5-7.00'e ayarlandı ve 20 ml'ye bidistile ile tamamlandı.(Taze hazırlandı)
- e. **Asidik butanol:** 5 ml Derişik HCl 95 ml n-butanol ile karıştırılarak hazırlandı(h/h).
- f. **Standart N-asetilnöraminik asid (NANA):** 10g. NANA, 100 ml'ye bidistile su ile tamamlandı.

2.8. Ham S.P.M.'de Protein Miktar Belirtimi İçin Kullanılan Kimyasal Madde ve Ayıraçlar

- a. **Ayıraç A:** 10 g.Na₂CO₃ ve 0.25 g. Na-K tartarat 500 ml'ye 0.1 N NaOH ile tamamlandı.
- b. **Ayıraç B:** %0.1 g. CuSO₄.5H₂O (%1 potasyum tartarat içinde)

c. Çalışma ayıracı: 45 ml A ayıracı ile 5 ml B ayıracı karıştırıldı. (Taze hazırlandı)

d. 1 N Folin-Ciocalteu fenol ayıracı: 100 g. sodyum wolframat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 25 g. sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 700 ml suda çözüldü. Çözöldükten sonra 50 ml %85'lik ortofosforik asid ve 100 ml derişik HCl ilave edildi. 1500 ml'lik cam balon joje içinde, geri soğutucu bağlanarak 10 saat kaynatıldı. Sonra 150 g. lityum sülfat (LiSO_4) 50 ml H_2O ve 5-6 damla brom katıldı. Bu karışım 15 dakika ağzı açık olarak çeker ocakta kaynatıldı (Brom dumanı uzaklaşınca kadar), soğutuldu ve 1lt.'ye bidistile su ile tamamlandı.

Normalitesinin ayarlanması; 0.1 ml konsantre Folin ayıracı 5 ml suya ilave edildi. Fenolftalein indikatörü kullanılarak 0.1 N NaOH ile titre edildi. Titrasyona pembe-gri renk elde edilinceye kadar devam edildi. Buna göre Folin ayıracı çalışırken 1:2 oranında su ile sulandırıldı.

e. Standart sığır serum albumini (SSA) (1 mg/ml): (Sigma) Bidistile su ile hazırlandı.

3. Aletler

- Hassas terazi (AND HR-120)
- Terazi (AND HF-2000G)
- Santrifüj (Heraeus Instruments Megafuge 1.0R)
- Ultrasantrifüj (Heraeus Cryofuge 6-6S)
- Vorteks, manyetik karıştırıcı (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik)
- pH metre (Hanna Instruments HI 9321 Microprocessor pH meter)
- Isıtıcıli magnetik karıştırıcı (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik ikamag-RH)
- Derin dondurucular (Forma Sceintific -80°C Freezer, Sanyo Medical Freezer -34°C)
- Otomatik pipetler, cam pipetler, pastör pipetleri

- Elektrikli su banyoları (Medisan elektronik,
- Teflon homojenizatör (Mechanik Prüfgerate medingen)
- Cam plaka
- Spektrofotometre (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000)



B. METODLAR

1. Eksojen Melatonin Uygulanışı

Genç grup hariç diğer yaş gruplarındaki sıçanlara 21 gün süre ile hergün sabah 10.30-11.00 saatleri arasında 2 mg/kg v.ağ. i.p. MLT enjeksiyonu yapıldı. Kontrol gruplarındaki hayvanlara da, aynı koşullarla 21 gün süreyle MLT'in çözündüğü alkollü serum fizyolojik, MLT gruplarına uygulanan miktara eş olarak verildi. Yalnızca, I.gruptaki kontrol ve deney sıçanlarına uygulamalar 15 gün süre ile yapıldı (Yaş dönemi kısa olduğu için).

Genç grubu oluşturan her iki cins sıçanlardan 12 adet kontrol, 13 adet deney olmak üzere ayrıldı. Doğumlarının 30cu günü deneylere başlandı, 45ci gün tamamlandı.

Genç-erişkin grubu oluşturan her iki cins sıçanlardan 12'si kontrol, 13'ü de deney olmak üzere ayrıldı. Doğumlarının 50-55ci günlerinde deneylere başlanan sıçanlar 70-75 günlük olduklarında 21 günlük uygulama tamamlandı.

Olgun-erişkin grubu oluşturan her iki cins sıçanlardan 15 adet kontrol, 15 adet deney olmak üzere ayrıldı. Doğum tarihlerinin 8.-12. aylarındaki hayvanlar seçilip, 21 günlük uygulama tamamlandı.

Yaşlı grubu oluşturan her iki cins sıçanlardan 10'u kontrol, 10'u deney olmak üzere ayrıldı. Doğum tarihlerine göre beslenip, büyütülen hayvanlar 20ci aydan sonra çalışmaya katıldı.

MLT uygulananının bitiminde, karanlık bir odaya alınan hayvanlar, o gece aç bırakıldılar. Sakrifikasyona başlamadan önce eter anestezisi için kullanılan cam fanus da siyah bir torba ile karartıldı. Tüm sıçanlar, hafif eter anestezisi altında intra-kardiak ponksiyonla sakrifiye edildi.

2. *Ham S.P.M. Eldesi*⁽¹²⁴⁾

Sıçanlardan sakrifikasyondan hemen sonra çıkarılan beyinlerin serebral korteksleri buz üzerinde ayrıldı. 10 hacim soğuk 50 mM imidazol tamponu (pH

7.2) ile buz içerisinde homojenize edildi. 625g'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant alındı, çöküntü atıldı. 30.000g'de +4°C'de 20 dakika santrifüj edildi. Böylece elde edilen ham sinaptosomal çöküntü 20 hacim 10mM imidazol tamponuyla (pH 7.2) süspansiyonlaştırıldı. 30.000g'de +4°C'de 20 dakika santrifüj edildi. Bu işlem üç kez tekrarlandıktan sonra, ham S.P.M. 10 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ile yeniden süspansiyonlaştırıldı.

Süspansiyonun bir kısmı AChE aktivitesi ölçümü için 1/3 oranında sulandırıldı. Geri kalan kısmı üç kez tuz-buz karışımı ile çatlatıldıktan sonra Na^+ , K^+ -ATPaz ve Ca^{2+} -ATPaz aktiviteleri ile sialik asid düzeyleri ölçüldü. (Sulandırmalar 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ile yapıldı)

2. S.P.M.'larda Na^+ , K^+ -ATPaz ve Ca^{2+} -ATPaz Aktiviteleri Ölçümü^(142,186)

S.P.M.'larda ATPaz aktiviteleri inkübasyon sırasında ortama konulan belirli konsantrasyonlardaki ATP substratından açığa çıkan inorganik fosfatın ölçülmesi⁽¹⁹⁷⁾ prensibine dayanır.

a. Na^+ , K^+ -ATPaz Metodu⁽¹⁴²⁾

İnkübasyon ortamında, son konsantrasyonları aşağıdaki şekilde belirtilen iki standart karışım kullanıldı: Bunlardan biri, Total ATPaz (Na^+ , K^+ /Mg²⁺ ATPaz) ölçülmesi için kullanılan standart karışımdır (Ortam A) ve 30 mM İmidazol, 30 mM glisil-glisin, 3 mM MgCl₂, 120 mM NaCl ve 5 mM KCl içerir. Diğeri ise, Mg²⁺-ATPaz ölçülmesi için kullanılan standart karışımdır (ortam B), bileşiminde ortam A'nın bileşiminden farklı olarak monovalan katyonların yerine 1 mM ouabain bulunur.

S.P.M.'larda Na⁺,K⁺-ATPaz Aktivitesi Deney Şeması

	Ayıraç Körü (Total)	Deney Körü	Total ATPaz	Ayıraç Körü (Mg ²⁺)	Deney Körü	Mg ²⁺ ATPaz
Ortam A	1.3 ml	1.2 ml	1.2 ml	-	-	-
Ortam B	-	-	-	1.3 ml	1.2 ml	1.2 ml
78mM ATP	-	50 µl	50 µl	-	50 µl	50 µl
Homojenat	-	-	50 µl	-	-	50 µl

*37°C'de 20` inkübasyon
Tüpler buza alınır*

1.2M HClO ₄	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Homojenat	-	50 µl	-	-	50 µl	-
	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Süpernatant	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Renk ayıracı	0.7 ml	0.7 ml	0.7 ml	0.7 ml	0.7 ml	0.7 ml

890xg'de 10` santrifüj edilir

*20` karanlıkta tüpler bekletilir
700 nm'de Ayıraç körüne karşı okunur.*

ATPaz'larla ilgili deney ve körleri çiftli olarak aynı anda çalışıldı.

Fosfor Standardı: Stok eriyik bidistile su ile 10 kez sulandırdı, bundan 1.3 ml alınıp üzerine 0.5 ml 1.2 M HClO₄ ilave edildi. Santrifüjlendikten sonra, süzüntüden 1 ml alındı. Bu filtrattaki fosfor konsantrasyonu 9.62x10⁻³ mg/ml'dir. Sonuçlar standart fosforla kıyaslanarak yapıldı.

Total ve Mg²⁺ ATPaz tüplerinde ATP'den açığa çıkan P_i miktarlarıyla enzimsiz kör değerleri arasındaki fark sırasıyla Total ATPaz ve Mg²⁺-ATPaz aktivitelerini verir. Total ATPaz ile Mg²⁺-ATPaz arasındaki farktan Na⁺,K⁺-ATPaz aktivitesi hesaplandı.

ATPaz aktiviteleri 20 dakikada mg protein başına µmol P_i olarak ifade edildi.

b. Ca^{2+} -ATPaz Metodu⁽¹⁸⁶⁾

İnkübasyon ortamında, son konsantrasyonları aşağıdaki şekilde belirtilen iki standart karışım kullanıldı: Bunlardan biri, Total ATPaz ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPaz) ölçülmesi için kullanılan standart karışımdır (Ortam A) ve 135 mM İmidazol-HCl, 5 mM MgCl_2 ve 0.05mM CaCl_2 içerir. Diğeri ise, Mg^{2+} -ATPaz ölçülmesi için kullanılan standart karışımdır (ortam B) ve bileşiminde ortam A'nın bileşiminden farklı olarak 0.05mM CaCl_2 yerine 0.5mM EGTA bulunur.

S.P.M.'larda Ca^{2+} -ATPaz Aktivitesi Deney Şeması

	Ayıraç Körü (Total)	Deney Körü	Total ATPaz	Ayıraç Körü (Mg^{2+})	Deney Körü	Mg^{2+} ATPaz
Ortam A	1.5 ml	1.4 ml	1.4 ml	-	-	-
Ortam B	-	-	-	1.5 ml	1.4 ml	1.4 ml
120mM ATP	-	50 μl	50 μl	-	50 μl	50 μl
Homojenat	-	-	50 μl	-	-	50 μl
<i>37°C'de 30` inkübasyon Tüpler buza alınır</i>						
%50 TCA	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Homojenat	-	50 μl	-	-	50 μl	-
<i>890 g'de 10` santrifüj edilir</i>						
	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Süpernatant	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Renk ayıracı	0.7 ml	0.7 ml	0.7 ml	0.7 ml	0.7 ml	0.7 ml

*20` karanlıkta tüpler bekletilir
700 nm'de Ayıraç körüne karşı okunur.*

ATPaz'larla ilgili deney ve körleri çiftli olarak aynı anda çalışıldı.

Fosfor Standardı: Stok eriyik bidistile su ile 10 kez sulandırıldı, bundan 1.5 ml alınıp üzerine 0.1 ml %50 TCA ilave edildi. 2700 rpm'de 10' santrifüj edildikten sonra, süzüntüden 1 ml alındı. Bu filtrattaki fosfor konsantrasyonu 12.5×10^{-3} mg/ml'dir. Sonuçlar standart fosforla kıyaslanarak yapıldı.

A ortamında ATP'den açığa çıkan P_i miktarları, Total ATPaz (Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPaz) aktivitesini, B ortamında açığa çıkan P_i miktarları Mg^{2+} -ATPaz aktivitesini verir. Total ATPaz ile Mg^{2+} -ATPaz değeri arasındaki fark, Ca^{2+} -ATPaz değerini verir. Ca^{2+} -ATPaz aktivitesi, 30 dakikada mg protein başına μ mol P_i olarak ifade edildi.

3.S.P.M.'larda AChE Aktivitesi Ölçülmesi⁽⁴⁹⁾

AChE aktivitesi substrat olarak ortama konulan asetiltiokolinin hidrolizi ile açığa çıkan tiokolinin, tiolünün 5,5'-DTNB iyonu ile reaksiyona girmesi sonucu sarı renkli ürün olan 5-tio-2-nitrobenzoik asidin spektrofotometrede ölçülmesi prensibine dayanır.

Ham S.P.M.'ları 1/3 oranında 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) tamponu ile sulandırıldı. 2.6 ml pH 8.00 olan 0.1 ml fosfat tamponu içeren küvete 0.4 ml S.P.M. homojenatı eklendi. 0.1 ml DTNB ayırıcı da aynı küvete eklendikten sonra küvet spektrofotometreye yerleştirildi ve 412 nm'de alet sıfırlanarak ayarlandı. Yani renk ayırıcının rengi bu şekilde sıfırlanmış oldu. Küvete 20 μ l substrat (asetiltiokolin iyodür) konulduğu anda kronometreye basıldı. 6 dakika boyunca absorbanstaki değişim dakika başına kaydedildi.

S.P.M. homojenatındaki AChE enzim aktivitesi hızı aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$$\frac{3.12 \times \Delta A}{13.6 \times (m)} \cdot 10^3 = \text{nmol tiokolin/ mg prot./1'}$$

3.12 : Deney ortamının toplam hacmi

ΔA : Dakikada değişen absorbens

13.6 : Asetiltiokolin iyodidin mM ekstinksiyon katsayısı

m : Homojenattaki mg protein miktarı

4. Ham S.P.M.'de Sialik Asid Düzeyinin Ölçülmesi⁽⁴²⁾

1983'de Denny ve arkadaşlarının sodyum arsenit kullanmadan uyguladıkları şekliyle 2-Tiobarbitürik asit metodu kullanıldı.

S.P.M.'larda Sialik Asid Düzeyinin Ölçülmesi Deney Şeması

	Kör	Standart	Deney
S.P.M. homojenatı	-	-	0.25 ml
0.1 M H ₂ SO ₄	-	-	0.25 ml
<i>80°C'de 1 saat inkübasyon, tüpler soğutulur 27.000 g'de 10' santrifüj edilir</i>			↓
Süpernatant	-	-	0.1 ml
Bidistile su	0.05 ml	-	-
%10 Sialik asit standartı	-	0.05 ml	-
0.1 M H ₂ SO ₄	0.05 ml	0.05 ml	-
0.025 M H ₅ IO ₆	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml
<i>37°C'de 30' inkübasyon Tüpler soğutulur</i>			
%5 Na ₂ S ₂ O ₃	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml
0.1 M TBA	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml
<i>100°C'de 15' inkübasyon Tüpler soğutulur</i>			
%5 asidik butanol	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml

*Vorteksle iyice karıştırılır, 400 g'de 5' santrifüjlenir
Butanol fazı 549 nm'de köre karşı okunur*

S.P.M.'larda sialik asid deęerleri homojenatın içerdięi protein g.'ı bařına dūřen μmol sialik asid olarak ifade edildi.

5. S.P.M. Homojenatının İçerdięi Protein Dūzeyinin Belirlenmesi⁽¹⁰⁴⁾

Protein miktar belirtimi Lowry yöntemine göre yapıldı. Bu yöntemde, proteine bağlı tirozin ve triptofan, fosfomolibdat tungstat kompleksini molibden mavisine indirger. Reaksiyon bakırla belirginleştirilir. Kr tüpüne 50 μl bidistile su, standart tüpüne 1 mg/ml protein solüsyonundan 50 μl ve S.P.M. homojenatından deney tüplerine 50 μl konuldu. 2.5 ml çalışma ayıracından tüm tüplere eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 25 μl seyreltilmiş Folin ayıracı tüplere ilave edildikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve deneyler 660 nm'de köre karşı okundu.

Enzim süspansiyonlarının içerdięi protein dūzeyleri standart olarak kullanılan SSA'e göre hesaplandı.

C. BİYOİSTATİSTİK YÖNTEMLER

Bulguların karşılaştırılması, parametrik olmayan istatistiksel yöntemler kullanılarak yapıldı. Kontrol gruplarıyla deney gruplarının kıyaslanmasında Mann-Whitney U, yaş gruplarının kendi içindeki karşılaştırmalarında ise Kruskal-Wallis yöntemleri kullanıldı.

BULGULAR

1. MLT uygulanmış her iki cins sıçanların ve bunlara uygun kontrollerin SPM'larında Na^+, K^+ -ATPaz aktivitelerinin aritmetik ortalamaları ($\mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/20 \text{ dk.}$)

a. 4-6 Haftalık Genç Grup

MLT uygulanmış 4-6 haftalık genç, her iki cins sıçanların SPM Na^+, K^+ -ATPaz aktiviteleri ortalama $5,775 \pm 0,51 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/20 \text{ dk.}$, kontrolleri ise $5,888 \pm 1,42 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/20 \text{ dk.}$ olarak bulunmuş olup her iki grup arasında anlamlı değişiklik gözlenememiştir (Tablo 4, Şekil 11).

b. 10 Haftalık Genç-erişkin Grup

Kontrol grubu sıçanların SPM Na^+, K^+ -ATPaz aktiviteleri ortalama $5,374 \pm 0,72 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/20 \text{ dk.}$; MLT uygulanmış sıçanlarda ise $5,830 \pm 0,93 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/20 \text{ dk.}$ olarak bulunmuştur. Kontrole göre kıyaslandığında enzim aktivitesinde anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 5, Şekil 11).

c. 8-12 Aylık Olgun-erişkin Grup

Her iki cins sıçanların kontrol grubunda SPM Na^+, K^+ -ATPaz aktiviteleri ortalama $7,031 \pm 2,12 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/20 \text{ dk.}$; MLT uygulanmış sıçanlarda ise $6,673 \pm 1,85 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/20 \text{ dk.}$ bulunmuş olup kontrol ve MLT grupları arasında anlamlılık bulunamamıştır (Tablo 6, Şekil 11).

d. 20-24 Aylık Yaşlı Grup

Kontrol grubu SPM Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesi ortalama $4,105 \pm 0,95 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/20 \text{ dk.}$ iken, MLT uygulanmış grupta $3,458 \pm 0,61 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/20 \text{ dk.}$ olarak bulunmuştur ve iki grup arasında anlamlılık saptanamamıştır (Tablo 7, Şekil 11).

Buna göre, eksojen MLT uygulanmış deney grupları kendi içinde yaş gruplarıyla kıyaslandığında, SPM Na^+, K^+ -ATPaz aktiviteleri, en yaşlı grubu oluşturan 20-24 aylık sıçanlarda diğer tüm yaş gruplarına göre anlamlı azalma göstermiştir ($p= 0,000$, $X^2: 19,094$). Ayrıca, kontrol grupları kendi içinde kıyaslandığında, enzim aktiviteleri aynı şekilde en yaşlı grupta diğer yaş gruplarına göre anlamlı azalma göstermiştir ($p= 0,005$, $X^2: 12,954$) (Tablo 9).

2. MLT uygulanmış her iki cins sıçanların ve bunlara uygun kontrollerin SPM'larında Ca^{2+} -ATPaz aktivitelerinin aritmetik ortalamaları ($\mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/30 \text{ dk.}$)

a. 4-6 Haftalık Genç Grup

4-6 haftalık genç kontrol grubu sıçanların SPM Ca^{2+} -ATPaz aktiviteleri ortalama $2,662 \pm 0,44 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/30 \text{ dk.}$; MLT uygulanmış sıçanların ise $2,615 \pm 0,65 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/30 \text{ dk.}$ olarak bulunmuş olup kontrol ve deneyler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 4, Şekil 11).

b. 10 Haftalık Genç-erişkin Grup

Kontrol grubu sıçanların SPM Ca^{2+} -ATPaz aktiviteleri ortalama $2,106 \pm 0,62 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/30 \text{ dk.}$; MLT uygulanmış sıçanlarda ise $1,918 \pm 0,60 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/30 \text{ dk.}$ olarak bulunmuş olup kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 5, Şekil 11).

c. 8-12 Aylık Olgun-erişkin Grup

Kontrol grubu sıçanların SPM Ca^{2+} -ATPaz aktiviteleri ortalama $2,076 \pm 0,22 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/30 \text{ dk.}$; MLT uygulanmış sıçanlarda ise $2,058 \pm 0,28 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/30 \text{ dk.}$ olarak belirlenmiş olup kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 6, Şekil 11).

d. 20-24 Aylık Yaşlı Grup

Kontrol grubunda $1,509 \pm 0,24 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/30 \text{ dk.}$ olan SPM Ca^{2+} -ATPaz aktivitesi MLT uygulanmış grupta $1,216 \pm 0,47 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.}/30 \text{ dk.}$ olup iki grup arasında anlamlı bir fark yoktur (Tablo 7, Şekil 11).

Buna göre, SPM Ca^{2+} -ATPaz aktiviteleri üzerine eksojen MLT uygulaması yaş gruplarına göre kıyaslandığında, genç grubu oluşturan 4-6 haftalık sıçanlara göre diğer yaş gruplarında görülen anlamlı azalma, yaşlı grubun genç-erişkin ve olgun-erişkin gruplarıyla kıyaslanmasında da aynı oranda saptanmıştır ($p=0,000$, X^2 : 21,839). Kontrolleri oluşturan yaş gruplarında da anlamlılık oluşturan gruplar gene aynı yaş gruplarıdır ($p=0,000$, X^2 : 22,451)(Tablo 9).

3. MLT uygulanmış her iki cins sıçanların ve bunlara uygun kontrollerin SPM'lerinde AChE aktivitelerinin aritmetik ortalamaları (nmol tiokolin/mg prot./1 dk.)

a. 4-6 Haftalık Genç Grup

4-6 haftalık genç kontrol grubu sıçanların SPM AChE aktiviteleri ortalama $206,84 \pm 40,5 \text{ nmol tiokolin/mg prot.}/1 \text{ dk.}$ iken MLT uygulanmış sıçanlarda $215,08 \pm 23,3 \text{ nmol tiokolin/mg prot.}/1 \text{ dk.}$ olarak bulunmuş ve kontrole göre anlamlı bir fark saptanamamıştır (Tablo 4, Şekil 12).

b. 10 Haftalık Genç-erişkin Grup

Genç-erişkin her iki cins sıçanların kontrol grubunda SPM AChE aktiviteleri ortalama $247,50 \pm 41,3 \text{ nmol tiokolin/mg prot.}/1 \text{ dk.}$ iken MLT uygu-

lanmış sıçanlarda ise $245,87 \pm 33,0$ nmol tiokolin/mg prot./1 dk. olarak bulunmuş ve kontrole göre anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 5, Şekil 12).

c. 8-12 Aylık Olgun-erişkin Grup

Kontrol grubu sıçanların SPM AChE aktiviteleri ortalama $246,95 \pm 60,02$ nmol tiokolin/mg prot./1 dk. iken MLT uygulanmış sıçanlarda ise $241,73 \pm 66,3$ nmol tiokolin/mg prot./1 dk. olarak bulunmuş ve kontrole göre anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 6, Şekil 12).

d. 20-24 Aylık Yaşlı Grup

20-24 aylık yaşlı sıçanların kontrol grubunda SPM AChE aktiviteleri ortalama $181,23 \pm 38,2$ nmol tiokolin/mg prot./1 dk. iken MLT uygulanmış sıçanlarda ise $165,01 \pm 47,4$ nmol tiokolin/mg prot./1 dk. olarak bulunmuş olup iki grup arasında anlamlı fark yoktur (Tablo 7, Şekil 12).

Buna göre, eksojen MLT uygulanmış genç-erişkin sıçanların SPM AChE aktiviteleri genç gruba göre anlamlı artmış ve yaşlı grupta enzim aktivitesi genç-erişkin ve olgun-erişkin gruplarına göre anlamlı azalmıştır ($p=0,002$, X^2 : 14,493). Kontrol gruplarında da gene aynı şekilde, genç-erişkin sıçanların SPM AChE aktiviteleri genç gruba göre anlamlı artmış ve yaşlı grupta enzim aktivitesi genç-erişkin ve olgun-erişkin gruplarına göre anlamlı azalmış olarak bulunmuştur ($p=0,011$, X^2 : 11,121) (Tablo9).

4. MLT uygulanmış her iki cins sıçanların ve bunlara uygun kontrollerin

SPM'lerinde Sialik Asid düzeylerinin aritmetik ortalamaları

($\mu\text{mol SA /g prot.}$)

a. 4-6 Haftalık Genç Grup

4-6 haftalık genç kontrol grubu sıçanların SPM SA düzeyleri sırasıyla ortalama 72.76 ± 29.16 $\mu\text{mol SA /g prot.}$ iken MLT uygulanmış sıçanların $68,85$

$\pm 25,21 \mu\text{mol SA /g prot.}$ olarak bulunmuş ve kontrole göre anlamlı bir fark sap-tanamamıştır (Tablo 8, Şekil 13).

b. 10 Haftalık Genç-erişkin Grup

Genç-erişkin her iki cins sıçanların kontrol grubunda SPM SA düzeyleri ortalama $55,77 \pm 28,34 \mu\text{mol SA /g prot.}$ iken MLT uygulanmış sıçanlarda $58,47 \pm 33,34 \mu\text{mol SA /g prot.}$ olarak bulunmuş olup gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 8, Şekil 13).

c. 8-12 Aylık Olgun-erişkin Grup

Kontrol grubu sıçanların SPM SA düzeyleri ortalama $70,02 \pm 18,58 \mu\text{mol SA /g prot.}$ iken MLT uygulanmış sıçanlarda ise $70,34 \pm 20,59 \mu\text{mol SA /g prot.}$ olarak bulunmuş ve gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 8, Şekil 13).

d. 20-24 Aylık Yaşlı Grup

20-24 aylık yaşlı sıçanların kontrol grubunda SA düzeyleri ortalama $69,80 \pm 21,15 \mu\text{mol SA /g prot.}$ iken MLT uygulanmış sıçanlarda ise $63,82 \pm 34,65 \mu\text{mol SA /g prot.}$ olarak bulunmuş olup gruplar arasında anlamlı bir fark buluna-mamıştır (Tablo 8, Şekil 13).

Buna göre, kontrol grupları ve eksojen MLT uygulanmış deney grupları ayrı ayrı kendi içinde yaş gruplarıyla kıyaslandığında, SPM SA düzeyleri hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlılık vermemiştir.

Tablo 4. Genç (4-6 hafta) kontrol ve MLT'li sıçanlarda SPM enzim aktiviteleri.

n	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPaz (μmol P _i /mg prot./20 dk.)		Ca ²⁺ -ATPaz (μmol P _i /mg prot./30 dk.)		AChE (nmol tiokolin/mg prot./1 dk.)	
	Kontrol	MLT	Kontrol	MLT	Kontrol	MLT
1	6,976	6,094	2,164	1,905	297,1	255,2
2	6,651	4,918	3,057	3,688	192,0	247,1
3	6,692	6,439	3,143	1,727	222,5	215,4
4	7,613	5,711	3,061	2,872	214,9	175,1
5	6,695	6,422	2,078	2,192	198,3	203,3
6	6,637	6,071	3,269	3,545	229,9	214,7
7	5,471	5,358	2,385	2,683	247,9	210,7
8	6,328	6,006	2,050	3,478	160,8	206,5
9	4,897	5,317	2,709	2,179	214,3	219,9
10	6,234	5,414	2,160	2,278	179,2	216,1
11	3,173		2,753	2,477	152,7	200,4
12	3,287			2,354	171,9	245,7
13						185,4
Ort.	5,888	5,775	2,662	2,615	206,8	215,0
±SD	1,42	0,51	0,44	0,65	40,5	23,3

Mann-Whitney U testine göre, kontrol ve MLT grupları arasında anlamlılık bulunmamıştır.

Tablo 5. Genç-erişkin (10 hafta) kontrol ve MLT'li sıçanlarda SPM enzim aktiviteleri.

n	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPaz (μmol P _i /mg prot./20 dk.)		Ca ²⁺ -ATPaz (μmol P _i /mg prot./30 dk.)		AChE (nmol tiokolin/mg prot./1 dk.)	
	Kontrol	MLT	Kontrol	MLT	Kontrol	MLT
1	4,908	4,990	3,304	2,527	266,5	256,7
2	5,841	4,444	1,811	2,385	201,0	306,4
3	5,421	5,084	1,579	2,214	183,8	302,9
4	5,514	4,875	2,231	2,305	191,0	250,1
5	5,945	7,134	1,426	1,487	209,3	232,7
6	4,235	6,044	2,849	1,067	265,6	249,2
7	4,959	7,012	2,023	3,057	280,5	244,9
8	4,538	5,953	2,564	1,839	292,6	257,8
9	5,746	6,439	2,388	1,569	306,3	255,5
10	6,632	6,326	1,443	1,892	249,0	220,9
11			1,547	1,659	250,5	214,7
12				1,013	273,3	193,0
13						210,9
Ort.	5,374	5,830	2,106	1,918	247,5	245,8
±SD	0,72	0,93	0,62	0,60	41,3	33,0

Mann-Whitney U testine göre, kontrol ve MLT grupları arasında anlamlılık bulunmamıştır.

Tablo 6. Olgun-erişkin (8-12 ay) kontrol ve MLT'li sıçanlarda SPM enzim aktiviteleri.

n	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPaz (μmol P _i /mg prot./20 dk.)		Ca ²⁺ -ATPaz (μmol P _i /mg prot./30 dk.)		AChE (μmol tiokolin/mg prot./1 dk.)	
	Kontrol	MLT	Kontrol	MLT	Kontrol	MLT
1	9,407	4,510	2,107	2,254	210,4	157,7
2	8,062	4,435	1,923	2,353	140,7	203,4
3	8,004	6,528	2,070	1,861	200,2	231,1
4	9,026	7,240	2,384	1,834	205,3	265,7
5	4,634	8,398	2,369	1,943	187,2	423,3
6	9,596	8,747	2,387	2,066	399,7	248,5
7	9,602	8,598	2,341	2,371	272,3	203,7
8	9,724	8,857	1,967	1,832	257,7	169,2
9	7,098	4,786	1,709	2,143	246,9	164,0
10	5,924	5,863	1,944	2,204	256,6	206,9
11	5,277	4,845	1,915	1,530	291,6	272,8
12	5,296	6,507	1,857	1,689	278,2	290,6
13	4,892	4,702	1,964	2,291	291,2	268,8
14	4,509	9,410		2,447	212,4	277,9
15	4,412				253,4	241,7
Ort.	7,031	6,673	2,076	2,058	246,9	241,7
± SD	2,12	1,85	0,22	0,28	60,0	66,3

Mann-Whitney U testine göre, kontrol ve MLT grupları arasında anlamlılık bulunmamıştır.

Tablo 7. Yaşlı (20-24 ay) kontrol ve MLT'li sıçanlarda SPM enzim aktiviteleri.

n	Na ⁺ ,K ⁺ -ATPaz (μmol P _i /mg prot./20 dk.)		Ca ²⁺ -ATPaz (μmol P _i /mg prot./30 dk.)		AChE (nmol tiokolin/mg prot./1 dk.)	
	Kontrol	MLT	Kontrol	MLT	Kontrol	MLT
1	4,907	3,969	1,238	1,885	169,3	212,8
2	3,709	3,643	1,326	1,516	174,4	232,9
3	3,720	3,089	1,296	1,689	134,2	227,4
4	4,447	3,003	1,947	1,765	128,8	156,5
5	2,688	4,474	1,577	1,328	150,4	162,2
6	5,629	2,569	1,289	0,953	212,6	118,7
7	3,188	3,183	1,476	0,674	217,3	114,0
8	4,549	3,733	1,623	0,788	220,2	130,7
9			1,804	0,744	223,4	129,5
10				0,820		
Ort.	4,105	3,458	1,509	1,216	181,2	165,0
± SD	0,95	0,61	0,24	0,47	38,2	47,4

Mann-Whitney U testine göre, kontrol ve MLT grupları arasında anlamlılık bulunmamıştır.

Tablo 8. Kontrol ve MLT'li tüm yaş gruplarındaki sıçanlarda SPM SA düzeyleri (µmol SA /g prot).

n	Genç Grup (4-6 Hafta)		Genç-erişkin Grup (10 Hafta)		Olgun-erişkin Grup (8-12 ay)		Yaşlı Grup (20-24 ay)	
	Kontrol	MLT	Kontrol	MLT	Kontrol	MLT	Kontrol	MLT
1	43,9	28,4	39,1	44,8	99,6	56,0	55,6	89,6
2	104,3	33,8	20,6	72,7	50,0	51,4	65,3	135,6
3	77,1	35,1	30,5	66,0	75,2	94,2	46,1	107,5
4	97,2	80,6	19,2	54,1	47,0	105,2	43,6	32,4
5	51,9	76,0	86,0	54,9	97,9	69,4	45,2	45,5
6	64,6	99,5	117,4	51,3	91,8	58,9	80,5	46,0
7	88,4	93,1	63,9	130,5	75,9	88,3	98,4	53,0
8	98,5	38,1	61,3	98,9	75,6	106,7	83,4	41,4
9	97,2	82,4	73,9	20,2	54,0	82,5	85,6	43,7
10	96,9	87,1	41,6	27,2	49,7	54,4	93,9	42,2
11	29,0	73,3	58,1	22,3	52,1	57,9		
12	23,7	82,4	57,1		71,3	47,5		
13		84,7			69,6	47,4		
14						76,9		
15						57,7		
Ort.	72,76	68,85	55,77	58,47	70,02	70,34	69,80	63,82
± SD	29,16	25,21	28,34	33,34	18,58	20,59	21,15	34,65

Mann-Whitney U testine göre, kontrol ve MLT grupları arasında anlamlılık bulunmamıştır.

Tablo 9. Farklı yaş gruplarındaki sıçanlarda SPM bağlı enzim aktiviteleri (Ort ± SD).

	$Na^+, K^+ - ATPaz$ (μ mol P_i /mg prot /20 dk.)	$Ca^{2+} - ATPaz$ (μ mol P_i /mg prot /30 dk.)	$AChE$ (nmol tiokolin /mg prot /1 dk.)
Genc G.(4-6 Hafta)			
Kontrol	5,888 ± 1,42 (n:12)	2,662 ± 0,44 (n:11)	206,84 ± 40,5 (n:12)
MLT	5,775 ± 0,51 (n:10)	2,615 ± 0,65 (n:12)	215,08 ± 23,3 (n:13)
Genc-eriskin G.(10 Hafta)			
Kontrol	5,374 ± 0,72 (n:10)	2,106 ± 0,62 (n:11) ^a	247,50 ± 41,3 (n:12) ^a ₃
MLT	5,830 ± 0,93 (n:10)	1,918 ± 0,60 (n:12) ^a	245,87 ± 33,0 (n:13) ^a ₁
Olgun-eriskin G.(8-12 Ay)			
Kontrol	7,031 ± 2,12 (n:15)	2,076 ± 0,22 (n:13) ^b	246,95 ± 60,02 (n:15)
MLT	6,673 ± 1,85 (n:14)	2,058 ± 0,28 (n:14) ^b	241,73 ± 66,3 (n:15)
Yasli G.(20-24 Ay)			
Kontrol	4,105 ± 0,95 (n:8) ^{c d e} _{2, 2, 2}	1,509 ± 0,24 (n:9) ^{c,d,e}	181,23 ± 38,2 (n:9) ^{d e} _{3, 3}
MLT	3,458 ± 0,61 (n:8) ^{c,d,e}	1,216 ± 0,47 (n:10) ^{c,d,e}	165,01 ± 47,4 (n:9) ^{d e} _{1, 1}

Kruskal-Wallis testi p değerleri (Kendi yaş gruplarına göre);

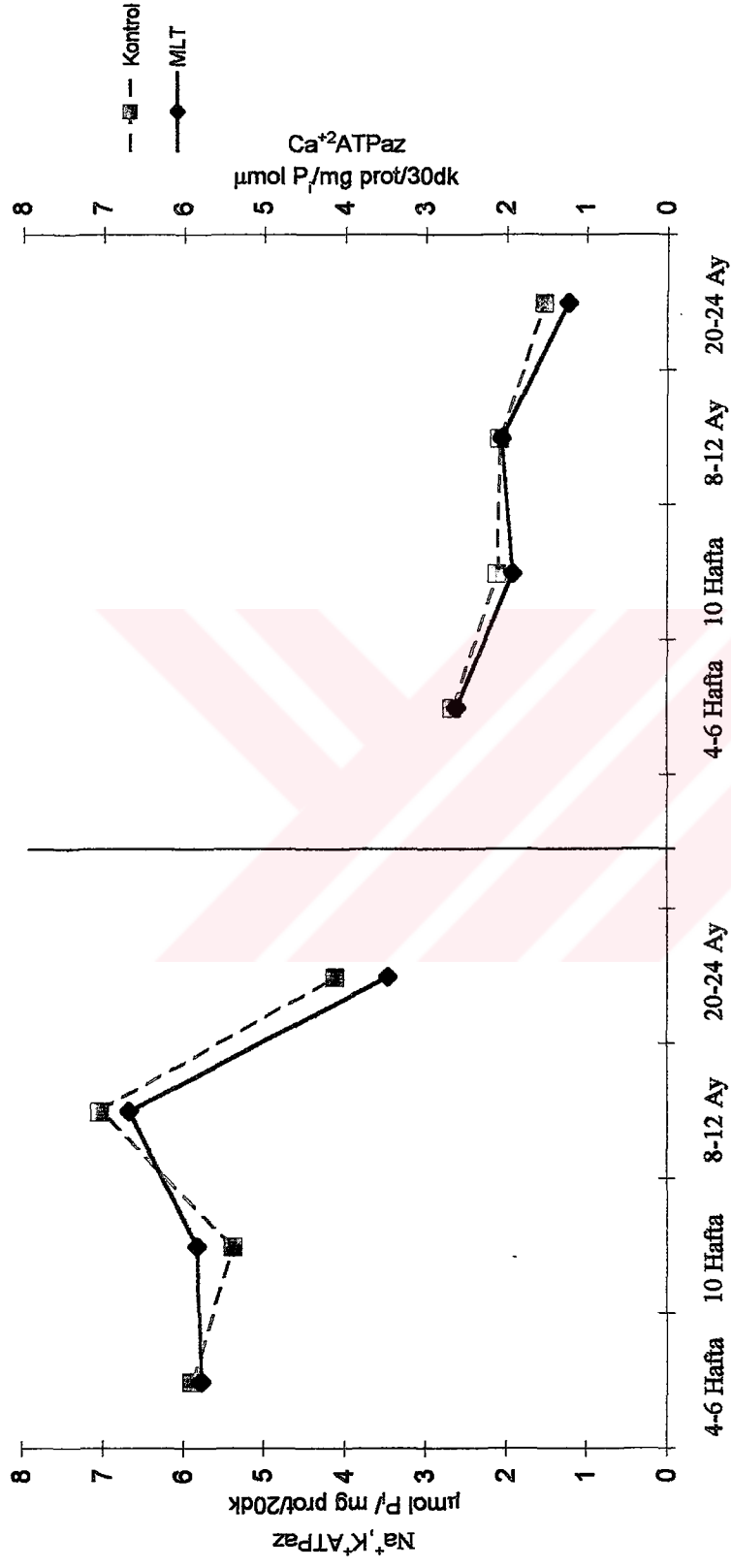
(a) I. ve II. Grup a - b - c - d - e ; 0,000

(b) I. ve III. Grup a₁ - d₁ - e₁ ; 0,002

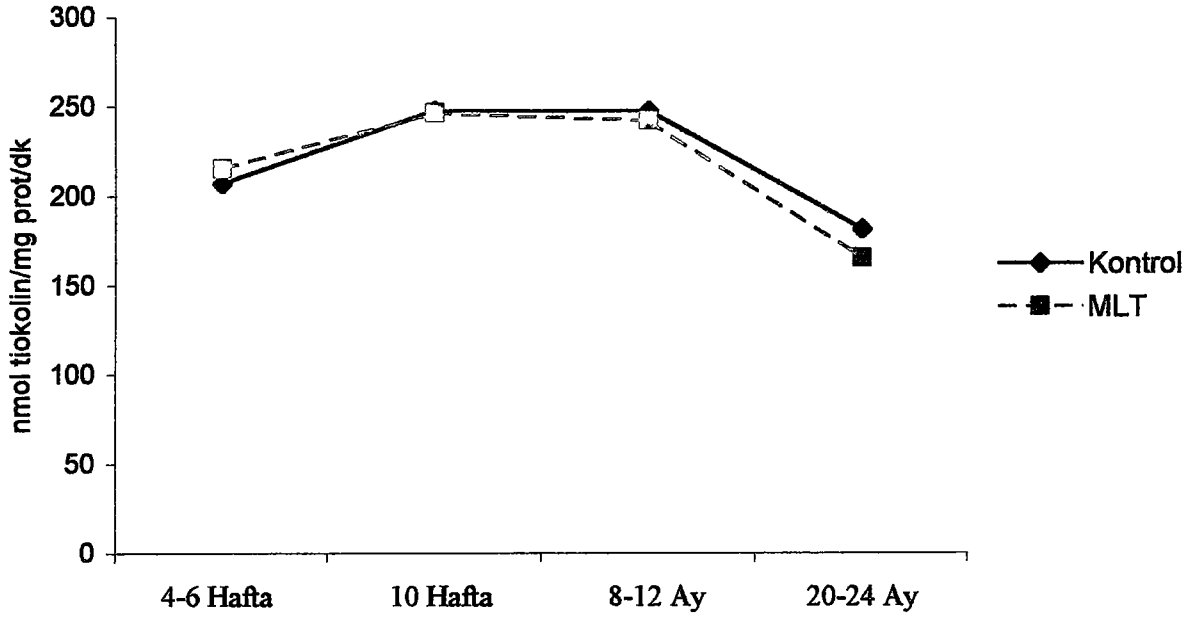
(c) I. ve IV. Grup c₂ - d₂ - e₂ ; 0,005

(d) II. ve IV. Grup a₃ - d₃ - e₃ ; 0,011

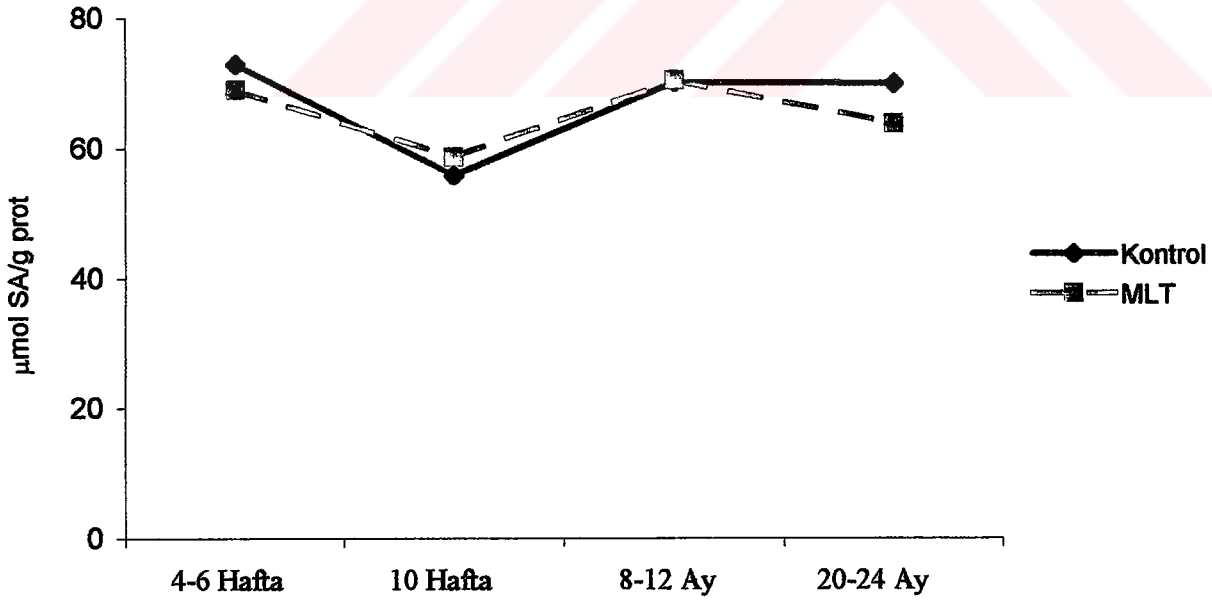
(e) III. ve IV. Grupları arasında



Şekil 11. Yaş gruplarında SPM ATPaz aktiviteleri.



Şekil 12. Tüm yaş gruplarında AChE aktiviteleri.



Şekil 13. Tüm yaş gruplarında SA düzeyleri.

TARTIŞMA

Yaşlanma, çevresel değişikliklere karşı uyum yeteneğinde azalma ve bozulan homeostazisin yeniden düzeltilmesinin zayıflaması durumu olduğu kadar, organik fonksiyonlarda genel bir gerileme olarak tarif edilmektedir. Yaşlanma ve onun beyindeki etkileri hemen hemen kaçınılmazdır. Temel yaşlanma olaylarının incelenmesinde en iyi yaklaşım hayvan modellerinin kullanımıdır. Laboratuvar kemiricilerinden öncelikle sıçanlar ve fareler çeşitli nedenlerle üstünlüğü tartışılmaz olan başlıca modellerdir. Bu nedenlerden birincisi, fare ve sıçanların birçok türleri ile ilgili ayrıntılı yaşam tablosu bilgilerinin olmasıdır. Bu bilgilerin eksikliğinde bir yaşlanma çalışmasının uygun şekilde planlanması hemen hemen olanaksızdır. İkincisi, laboratuvar kemiricilerinin, kendi bilimsel yaşam süreleri içinde araştırmacıların çok sayıda yaşlanma ile ilgili çalışmaları gerçekleştirebilmelerine olanak verebilecek kadar kısa bir ömürleri vardır. Üçüncüsü, hem parasal açıdan, hem de enfeksiyondan yoksun barınma ortamlarını sağlama bakımından oldukça düşük maliyetle bakılabilmeleridir⁽¹⁰⁹⁾. Bu çalışmada da yaşam süresi içinde nöral transport fonksiyonlarını membrana-bağlı enzim aktivitelerini ölçmek yolu ile incelemek için; deneysel model olarak sıçanların kullanılması ve organ modeli olarak da yaşlanma olayından beyin sapından daha çok etkilendiği bildirilen⁽²⁵⁾ serebral korteks'in seçilmesi uygun bulunmuştur. ATPaz ve AChE aktiviteleri, bu enzimlerin korteksin diğer subsellüler kısımlarına göre daha zengin olarak bulunduğu SPM'lerinde araştırılmıştır^(55,59,79).

Tüm deneysel bulgular ve klinik bilgiler, ihtiyarlığın başlangıcı ve ilerlemesinde pineal bezin ve MLT'in rolü olduğunu ileri sürmektedir^(8,28). Bu varsayımlar, MLT'in bazı biyolojik fonksiyonlardaki öneminden ve birçok türün çok yaşlı bireylerinde sirkadyen MLT ritminin zorlukla saptanmasından dolayı,

yaşam boyunca organizmada MLT yapımının giderek kaybı gerçeğinden kaynaklanmıştır. MLT'in MSS üzerine etki mekanizması aydınlatılamamış olmasına rağmen, bu hormonun nörotransmitter sistemlerinin ve beynin membran olaylarının modülasyonu yolu ile nöronal aktivitenin etkileniminde bir rolü olduğunu destekleyen bazı bilgiler vardır⁽³⁷⁾. MLT'in nöronal aktivitenin kontrolündeki hayli önemli rolü ve yaşlanma ile gözlenen MLT ve bazı motor bozukluklar arasındaki olası ilişkiye rağmen, bu konu ile ilgili çok az çalışma vardır.

Nöronal eksitabilite büyük ölçüde Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesine bağlıdır. MLT'in beyin Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesini değiştirerek nöronal eksitabiliteyi değiştirdiği bildirilmiştir⁽²⁾. Literatürde yaşlanma durumunda pineal bezin fonksiyonu ve morfolojisinde bildirilen giderek artan bozulmanın transport fonksiyonundan sorumlu enzimleri nasıl etkilediği ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, pineal bezin ve MLT'in membrana bağlı enzimler üzerine in vivo ve in vitro etkileri konusunda, son yıllarda literatürde rastlayabildiğimiz iki çalışmada, serbest radikal oluşturan bir ilaç olan alloksan verilmiş sıçanlarda, eksojen MLT'in kardiyak sarkolemmal Ca^{2+} pompasına etkisi incelenmiş ve alloksan'ın oluşturduğu Ca^{2+} -ATPaz inhibisyonunu önlemesi nedeniyle anti-oksidan etkili olduğu gösterilmiştir^(31,32). Bu nedenle çalışmamız, yaşlanma önleyici ve nöroprotektif bir ajan olduğu ileri sürülen MLT'in eksojen verilmesiyle postnatal gelişen çeşitli yaş gruplarındaki sıçanlarda sinaptosomal transport fonksiyonlarının ne yönde etkileneceğini, membrana bağlı Na^+, K^+ -ATPaz, Ca^{2+} -ATPaz ve AChE aktivitelerinin ölçülmesi yoluyla araştıran öncül çalışmalardan biridir.

Çalışmamızda farklı yaş gruplarındaki her iki cins kontrol grubu sıçanların beyin korteksi SPM Na^+, K^+ -ATPaz aktivitelerinin ortalama değerlerinin $4.105-7.031 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.} / 20 \text{ dk.}$ arasında değiştiği bulunmuştur. Literatürde sıçan beyin korteksinde Na^+, K^+ -ATPaz aktivitelerinin aritmetik ortalamaları uygulanan yöntemle, kullanılan sıçanın türü ve cinsiyeti ile ilişkili olarak $0.06-27 \mu\text{mol P}_i / \text{mg prot.} / \text{saat}$ arasında geniş dağılımlar göstermekte-

dir^(97,128,143,144,170). Bizim değerlerimiz; literatürde belirtilen kontrol grubu değerleri ile uyumludur.

Na⁺,K⁺-ATPaz aktivitesi üzerine yaşlanmanın etkisi konusundaki çok az sayıdaki ve genellikle eritrosit^(26,73,87,134), beyin^(11,21,26,86,89,90,95,120,173,174,202,203,210) ve karaciğer^(72,126) gibi organlarda yapılan çalışmalarda yaşlanmanın enzim aktivitesindeki azalmaya eşlik edip etmediği tam olarak belirlenememiştir. Beyin dokusunda yaşlanmayla ilişkili Na⁺,K⁺-ATPaz aktivitesi bulguları hayli çelişkilidir. Bazı araştırmalarda beyin Na⁺,K⁺-ATPaz aktivitesinde yaşla ilgili azalma^(11,21,40,89), bazılarında artma^(26,86,202,203,210) bildirilmişken, bazı araştırmacılar enzim aktivitesinde yaşla ilişkili hiçbir değişiklik bulamamıştır^(78,90,95). Beyinde yaşla ilişkili artış olduğunu bildiren çalışmaların bir kısmı bizim çalışma koşullarımızdan oldukça farklıdır^(86,210). Bu çalışmalarda yaşlanma süresi doğumdan sonraki 20 gün ile 60 gün arasında incelenmiştir.

Çeşitli yaş gruplarındaki kontrol sıçanlar birbirleriyle kıyaslandığında sütten kesilme döneminden olgun erişkinlik dönemine kadar SPM Na⁺,K⁺-ATPaz aktivitelerde anlamlı bir değişiklik bulunamazken, en yaşlı grupta diğer yaş gruplarına göre anlamlı azalma olduğu gözlenmiştir. Sıçan serebral korteksinde Na⁺,K⁺-ATPaz'ın postnatal ilk 4 hafta içinde, doku kitlesine göre daha fazla sentezlenmesinden dolayı arttığı, daha sonraları sentezlenme ve doku gelişimi arasındaki dengelenme nedeniyle düz bir plato çizdiği bildirilmiştir⁽¹⁷³⁾. Çalışmamızda da, enzimin en hızlı sentezlendiği neonatal dönemden sonraki yaş dönemlerinde enzim aktivitesinde değişiklik olmamasının, bu araştırmanın bulgularıyla uyumlu olduğu düşünülebilir. Yaşlı sıçanların korteksinde azalmış Na⁺,K⁺-ATPaz aktivitesi ile ilgili bulgumuz 24 aylık sıçanların SPM'lerinde enzim aktivitesinin azaldığını bildiren araştırmacıların bulguları ile aynı doğrultudadır^(11,21,40,89).

Nöronlarda Ca²⁺ konsantrasyonlarının ince ayarı ve dinlenme durumundaki normal düzeylerinin sürdürülmesinden sorumlu SPM Ca²⁺-ATPaz aktivitelerinin de yaşlı gruptaki kontrol sıçanlarda genç ve erişkin gruplara göre önemli derecede azalmış olduğu gözlenmiştir. Literatürde yaşlanma durumunda beyin Ca²⁺-ATPaz aktivitelerinin incelendiği ancak birkaç çalışmaya bulun-

maktadır^(11,65,141,214,215). Bizim bulgumuz yaşı sıçanların SPM'lerinde Ca^{2+} -ATPaz aktivitelerinin azaldığını bildiren araştırmacıların bulguları ile iyi uyumludur^(11,141,214,215), fakat birine uymamaktadır⁽⁶⁵⁾. Bu farklılık son çalışmada Ca^{2+} -ATPaz aktivitesinin bizim çalışmamızdan farklı olarak mikrozomlarda ve yalnızca dişi sıçanlarda araştırılmış olmasından kaynaklanabilir.

SPM'a bağlı bir başka transport enzimi olan ve ACh'ı hidroliz ederek kolinerjik iletide rol alan AChE'nin da ATPaz'lar gibi kontrol grubu yaşı sıçanlarda diğer yaş gruplarına göre azalmış olduğu bulunmuştur. Bu konuda literatürde rastladığımız yaşı sıçanların serebral korteksinde AChE'nin gençlere göre azaldığını bildiren iki çalışmanın^(112,180) bulguları da bizim bulgumuz ile aynı doğrultudadır. Postnatal gelişme ile AChE'da artma bulan bir başka çalışmada⁽¹¹⁹⁾, sıçan beyni homojenatları 4. günden 90. güne kadar incelenmiş ve AChE'nin 17. güne kadar arttığı daha sonra düz bir plato izlediği bildirilmiştir. Çalışmamızda ise, 6 haftalıktan 10 haftalığa kadar arttıktan sonra 12. aya kadar düz bir plato izlediği gözlenmiştir.

Serebral sinaptik kompartımanın yaşlanma durumuna karşı hayli duyarlı olduğu bilinmektedir⁽¹¹⁾. Yaşlanma durumunda membranın çok önemli transport enzimleri olan Na^+ , K^+ -ATPaz, Ca^{2+} -ATPaz ve AChE aktivitelerinde genç gruba kıyasla saptadığımız azalma, enzim proteini ile ilgili yapısal ve/veya çevresel birkaç faktörün etkisiyle açıklanabilir. Sinaptik plazma membranlarının göstergesi olarak kabul edilen Na^+ , K^+ -ATPaz aktivitesindeki azalma, bu membran enziminin membrandan geçen Na^+ gradyeni, intrasellüler K^+ konsantrasyonu ile ilişkili elektriksel olaylardaki temel rolü nedeniyle birincil öneme sahip olabilir.

Çalışmamızda yaşı sıçanlarda saptadığımız membrana bağlı ATPaz aktivitelerinin azalmasına yol açabilecek en yüksek olasılıklardan biri protein molekülünde yaşlanma ile ilişkili yapısal değişiklikler olabilir^(44,56). Bu posttranslasyonel yapısal değişiklikler proteinlerin hatalı katlanması veya onların normal, fonksiyonel, şekilsel (örn. fosforilasyon) değişiklikleri yüzündendir^(44,195). Gerçekten protein molekülünün protein kinaz C tarafından ek bir fosforilasyonunun Na^+ , K^+ -ATPaz aktivitesini bozduğu bilinmektedir⁽¹³⁾. Her yıl

vücut proteinlerinin %0.1 kadarının dekstrorotasyona uğradığının bildirilmesi⁽⁴⁴⁾ de bu kanıyı destekleyici bir başka bilgidir. Protein molekülünün yapısal katlanmasına, yaşlanma sırasında arttığı bildirilen serbest radikallerin^(44,68,92,133) ve Maillard reaksiyonu yolu (Şekil 6) ile açığa çıkan ileri glikasyon ürünleri denilen makromoleküllerin^(107,109,121,187) neden olduğu ileri sürülmüştür. Yaşla ilgili bazı dejeneratif durumlardan da bu ileri glikasyon ürünlerindeki artışın sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda incelediğimiz tüm membrana bağlı enzimlerin aktivitele-
rinin membranların yapısal bütünlüğüne ve yakın çevresindeki fosfolipidlerin
bileşimine bağlı olduğu bilinmektedir. Bu yüzden membran fosfolipid bileşimini
değiştiren herhangi bir etken bu enzimlerin aktivitelerini de değiştirecektir. Bu
nedenle, çalışmamızda yaşlı sıçanlarda SPM'a bağlı enzimlerde saptadığımız
azalmaya yol açabilecek ikinci yüksek olasılık, enzim molekülünün çevresinde
serbest radikal oluşumu yüzünden membran fosfolipidlerinin yıkımının neden
olduğu çevresel değişiklikler olabilir. Gerçekten fosfolipid yıkım ürünleri olan
çok doymamış serbest yağ asitlerinin ve diacilgliserolün Na^+, K^+ -ATPaz'ı inhibe
ettiği gösterilmiştir^(50,210). Ayrıca, yaşlanma ile birlikte sinaptozomlar dahil
birçok biyolojik membranlarda kolesterol ve doymuş fosfolipidler gibi
sertleştirici membran bileşiklerindeki artmanın akışkanlığı azaltarak
integral transport proteinlerde fonksiyonel azalmaya yol açtığı
bildirilmiştir^(33,141). Buna göre, membranın bu ana bileşiklerindeki yaşlanmaya
bağlı olabilecek değişiklikler lipid-ATPaz etkileşimini bozarak enzim
aktivitesinin inhibisyonuna yol açabilir.

Beyin çok doymamış yağ asitlerinden zengin olduğundan peroksidas-
yona karşı ileri derecede duyarlıdır^(4,12,50), ve membran lipid peroksidasyonunun
membran fonksiyonları üzerine olan zararlı etkileri iyi tanımlanmıştır^(18,33). Lipid
peroksidasyonu yaşlanma sırasında hücrel membran hasarının mekanizması
olarak kabul edilmektedir⁽⁶⁸⁾. ATPaz aktivitesindeki azalma yaşlanma sırasında
lipid peroksidasyonları sonucunda açığa çıkan serbest radikallerin enzimin aktif
bölgesine veya enzimin çevresindeki lipidlere hücumu nedeniyle olabilir. Ancak

lipid peroksidasyonu ve plazma membranı Na^+, K^+ -ATPaz ile ilişkili sorun 25 yıldan fazla bir zamandan beri bilinmesine rağmen⁽¹⁹²⁾, hala tartışmaya açıktır.

İnsan beyinde yaşlanma ile biriktiği bildirilen^(121,187) ileri glikasyon ürünlerine bağlı protein molekülünün enzimsel olmayan glikasyonu da yaşlanma durumunda ATPaz aktivitesinin azalmasına ve böylelikle nöral transport fonksiyonunun bozulmasına yol açabilecek bir diğer faktör olabilir. Na^+, K^+ -ATPaz ve tubulin gibi önemli fonksiyonel proteinlerdeki enzimsel olmayan glikozilasyonun^(58,117) aksonal transport ve sinir iletiminin bozulmasında rolü olabileceğinin bildirilmesi⁽¹⁵⁾ bu düşüncemizi destekleyici yöndedir.

Bozulmuş Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesinin intrasellüler Na^+ 'da bir artışa, membran depolarizasyonu ve voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarından Ca^{2+} girişine yol açtığı bilinir⁽⁷⁰⁾. Bu yüzden bozulmuş Na^+, K^+ -ATPaz aktivitesi yaşlanmada nöronal eksitotoksitenin patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabilir.

Ca^{2+} -ATPaz aktivitesinde yaşla ilişkili azalma nöronal Ca^{2+} homeostazisinin düzenlenmesinin bozulmasına yol açabilecektir ve böylelikle hücre ölümüne kadar giden biyokimyasal bozukluklara neden olabilecektir. Nöronal Ca^{2+} homeostazisinde yaşın ilerlemesiyle olan değişikliklerin düşünsel fonksiyonların yaşla ilişkili bozukluklarında rolü olabileceği bildirilmiştir⁽⁶⁹⁾. Bu yüzden, beyin Ca^{2+} homeostazisinin bozulmasının beyin hastalıklarının ortaya çıkışında temel bir rolü olabileceğini düşünmek mantıklı olacaktır.

Genç sıçanlarda AChE metabolizmasının daha yüksek olduğu bildirilmiştir⁽⁸⁵⁾. Bu yüzden genç sıçanlarda yaşlılara kıyasla daha yüksek AChE aktivitesinin bulunması gençlerde ACh metabolizmasının daha yüksek olmasıyla ilişkili olabilir. Elektronmikroskopik incelemelere göre kolinerjik sistemlerin yaşlanma ile azalmasının sinapslardaki azalmaya bağlı olabileceği gösterilmiştir⁽⁵²⁾.

15 ile 21 gün süreyle sıçan vücut ağırlığının kg başına 2 mg i.p. MLT injeksiyonu yapılmış tüm yaş gruplarındaki sıçanlarda SPM Na^+, K^+ -ATPaz, Ca^{2+} -ATPaz ve AChE aktiviteleri ile kendi kontrol grupları arasında anlamlı bir değişiklik saptanamamıştır. Bu bulgular hangi yaş grubunda olursa olsun eksojen MLT verilmesinin membrana bağlı enzimleri etkilemediğini düşündürmektedir.

Eksojen MLT ve membrana bağılı enzim aktiviteleri konusunda literatürde yok denecek kadar az çalışma olduğundan bulgularımızı karşılaştırma olanağı da son derece sınırlıdır. ATPaz ve MLT etkileşimi konusunda literatürde bulunan çalışmalardan birinde⁽³¹⁾ izole kardiyak sarkolemmal $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$ bağımlı ATPaz aktivitesinin MLT'le uyarıldığı diğerinde⁽³²⁾, eksojen MLT'in alloksan enjekte edilmiş sıçanların kardiyak membranlarında Ca^{2+} -ATPaz aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Ancak, fizyolojik dozda (1 mg/kg v.a.) uygulanan MLT'in alloksana bağılı Ca^{2+} -ATPaz aktivitesi baskılanması üzerine önemli bir etki oluşturmadığı, 5 ve 10 mg/kg v.a. gibi supratrapötik ve farmakolojik dozlarda eksojen MLT'in doza bağımlı olarak artan baskılanmayı önleyici anlamlı bir etki yaptığı bildirilmiştir. Buna karşılık gerek fizyolojik gerekse farmakolojik (10 mg/kg v.a.) dozlarda eksojen MLT verilisinin kardiyak sarkolemma Na^+,K^+ -ATPaz aktivitesini kontrollere göre biraz azaltmakla birlikte anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı bildirilmiştir⁽³²⁾. Bizim çalışmamıza göre fizyolojik dozlarda verilen eksojen MLT'in membrana bağılı enzimleri etkilemediği konusundaki düşüncemiz bu çalışmanın bulgularıyla iyi uyum göstermektedir.

Tüm yaş gruplarındaki eksojen MLT verilmiş sıçanlarda ATPaz aktiviteleri kontrollerine göre anlamlı bir farklılık göstermese de, genç-erişkin grup Na^+,K^+ -ATPaz'ı hariç tüm MLT uygulanmış gruplarda enzim aktivitelerinin biraz azalmış olduğu saptanmıştır. Bu azalmalar yaşlı grupta daha da belirgindir. Bu bulgu literatürde son yıllarda MLT'in yaşlanma karşıtı bir faktör^(5,8,155) olabileceği varsayımına zıt gibi görülmektedir. Literatürde MLT'in yaşlanmayı geciktirici etkisiyle uyumlu olmayan en azından iki çalışma^(132,140) da vardır. Bunlardan birinde⁽¹³²⁾, içme suyunda günlük verilen MLT'in Yeni Zelanda türü siyah dişi farelerde hayat sürecini uzattığı halde, C3H/He türü farelere yapılan aynı uygulamanın hayat sürecinin kısalmasına ve üreme yolları tümörlerinin daha yüksek sıklıkla oluşmasına yol açtığı bildirilmiştir. Çok yeni olan diğerinde ise⁽¹⁴⁰⁾ uzun süreli düşük ve yüksek doz MLT verilisinin doğal öldürücü hücre aktivitesinde ve lenfositlerin çoğalma yeteneğinde yaşa bağımlı bozulmayı düzeltmediği bildirilmiştir. Bu yüzden de MLT'in yaşlanmayı geciktirici bir faktör olabileceği konusunda varsayımların kesinlik kazanması için

daha uzun ve derin çalışmalar gerektiği kabul edilmektedir⁽¹⁶¹⁾. Çalışmamıza göre de yaşlı sıçanlarda azalan beyin transport enzim aktiviteleri üzerine eksojen verilen MLT'in en azından fizyolojik dozlarda iyileştirici bir etki göstermemesi nedeniyle bu dozlarda yaşlanma karşıtı bir faktör olarak kabul edilemeyeceği düşünülebilir. Uzun süreli eksojen MLT verilisinin yaşlanmaya bağlı immun sistem bozulmasını düzeltmediğini bildiren çalışma⁽¹⁴⁰⁾ bu varsayımımızı destekleyici yöndedir.

Çalışmamızda, MSS'nde en yüksek oranda bulunan sialoglikolipidler (gangliozid) ve sialoglikoproteinlerin bileşiminde bulunan özellikle nöronal plazma membranında membrana bağlı şekilde oluşan SA düzeylerinin tüm yaş gruplarında farklı değişiklikler göstermediği saptanmıştır. Yaşlanma durumunda SA düzeyleri ile ilişkili çok az sayıdaki çalışmalarda yaşlanma ile sıçanların bazı dokularında⁽⁸⁵⁾, yaşlanmış eritrosit, trombosit gibi hücrelerde⁽¹⁸⁹⁾ SA'in azaldığı ve SPM'larda 50. güne kadar SA içeriğinin arttığı⁽⁴⁷⁾ ya da çeşitli yaş gruplarındaki insanların lenfositlerinde SA içeriğinin yaşlanma ile ilişkili anlamlı değişiklik göstermediği şeklinde farklı bulgular bildirilmiştir⁽⁶⁾.

SPM bağlı enzimlerde en yaşlı grupta anlamlı bir azalma olduğu halde, SA düzeylerinde en yaşlı grup dahil tüm yaş gruplarında belirgin bir değişiklik saptanmaması ile ilgili bulgumuz, membranda enzim aktivitesi değişiklikleri ile birlikte SA içeriği arasında sebepsel bir ilişki olmadığını düşündürmektedir. 7-50 günlük sıçanlarda beyin GGT aktiviteleri ve SA içeriğinin incelendiği bir çalışmada; 50 güne kadar olan gelişim süresince GGT aktivitesinin gelişme ile paralel artmasına karşılık, SA'in ancak 7 ile 12. günler arasında arttığının, daha sonra değişmediğinin bildirilmesi, bu konudaki düşüncemizi destekleyici bulgudur⁽⁴⁷⁾. Bulgularımıza göre, MSS'in normal gelişimi (ontogenezi örn; hücre-hücre tanımı) ve fonksiyonlarında (örn; taşıyıcı-aracılı transport) önemli rolleri olan SA'lerin, membrana bağlı enzimlerin aksine yaşlanma ile ilişkili dejeneratif olaylardan etkilenmediği düşünülebilir.

Sonuç olarak, yaşlanma durumunun nöral hücrelerde normal iyonik asimetrisinin korunması ve nöral transport fonksiyonlarının sürdürülmesinden sorumlu Na⁺,K⁺-ATPaz, Ca²⁺-ATPaz ve AChE aktivitelerinde depressif etki

yaptığı ve bu yüzden bozulmuş enzim aktivitelerinin nöronal eksitotoksitenin gelişiminde önemli bir rolü olabileceği kanısına varılmıştır. Buna karşılık, yaşlanma durumu beyin membranlarının önemli bir yapısal bileşici olan SA düzeylerini olumsuz etkilememesine rağmen, eksojen verilen fizyolojik dozlarda MLT'in yaşlanmanın enzimler üzerindeki depressif etkisini ortadan kaldıramadığından, en azından bu dozlarda yaşlanmayı geriletici bir faktör olarak gösterilmesinin kuşku uyandırıcı bir varsayım olduğu düşünülebilir..



ÖZET

Multifaktöryel dejeneratif bir olay olan yaşlanma, beyindeki sinir hücrelerini oldukça geniş çapta etkiler. Yaşlanan beyinde gözlenen değişiklikler, nöronal fonksiyonda ilerleyici bir azalma ile birlikte bir miktar nöronal kayıp olarak tarif edilir. MSS'de yaşlanmaya yol açan hiçbir spesifik faktör belirlenememiştir. Bununla beraber, deneysel bulgular ve klinik veriler, yaşlanmanın başlangıcı ve ilerlemesinde pineal bezin bir rolü olduğunu düşündürmüştür. MLT'in MSS üzerine etki mekanizması aydınlatılamamış olmasına rağmen, bu hormonun nörotransmitter sistemlerinin ve beynin membran olaylarının modülasyonu yolu ile nöronal aktivitenin etkileniminde rolü olduğunu destekleyen çalışmalar vardır. Son yıllarda MLT'in yaşlanma önleyici bir ajan olduğu da ileri sürülmüştür. Ancak, yaşlanma durumunda pineal bezin fonksiyonu ve morfolojisinde giderek artan bozulmanın, transport fonksiyonundan sorumlu enzimleri nasıl etkilediği bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamız, yaşlanma önleyici ve nöroprotektif bir ajan olduğu ileri sürülen MLT'in eksojen verilışı ile, postnatal gelişen çeşitli yaş gruplarındaki sıçanlarda, sinaptozomal transport fonksiyonlarının ne yönde etkileneceğini membrana bağlı Na^+, K^+ -ATPaz, Ca^{2+} -ATPaz ve AChE aktivitelerinin ölçülmesi yolu ile araştırmak ve bu nörohormonun sinir sistemindeki bilinmeyen etkilerini aydınlatmak için planlanmıştır.

Bu amaçla her iki cinsten 4-6 haftalık genç, 10 haftalık genç-erişkin, 8-12 aylık olgun-erişkin ve 20-24 aylık yaşlı olmak üzere dört gruba ayrılan toplam 101 adet Wistar-Albino sıçan kullanıldı. Her yaş grubundaki sıçanların bir grubuna 21 gün süre ile (genç gruba 15 gün) 2 mg/kg v.ağ. MLT i.p. olarak verildi. MLT'in çözündüğü alkollü serum fizyolojik verilen gruplar kontrol

olarak kullanıldı. MLT uygulananının sonunda kardiyak-pompsiyonla hafif eter anestezisi altında sakrifiye edilen sıçanlardan ayrılan serebral kortekslerinden SPM'ları elde edildi. SPM'larda Na^+, K^+ -ATPaz, Ca^{2+} -ATPaz ve AChE aktiviteleri ve SA düzeyleri ölçüldü

Sütten kesilme döneminden olgun-erişkinlik dönemine kadar kontrol grubu sıçanlarda SPM Na^+, K^+ -ATPaz aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik bulunmazken, yaşlı grupta diğer yaş gruplarına göre anlamlı azalma saptanmıştır. Ca^{2+} -ATPaz aktivitelerinin ise en yaşlı gruptaki sıçanlarda, genç ve erişkin gruplara göre anlamlı azaldığı bulunmuştur. Benzer şekilde SPM AChE aktiviteleri de en fazla en yaşlı grupta azalmış bulunmuştur.

Eksojen MLT uygulanması, SPM Na^+, K^+ -ATPaz, Ca^{2+} -ATPaz ve AChE aktivitelerinde kendi kontrollerine göre anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Bu nedenle, eksojen MLT verilmesinin hangi yaş grubunda olursa olsun membrana bağlı enzimleri etkilemediği ve en azından fizyolojik dozlarda MLT'nin yaşlanmanın neden olduğu membrana bağlı enzim inhibisyonlarını önleyemediği düşünülmüştür.

Tüm yaş gruplarındaki kontrol ve MLT uygulanmış sıçanlarda SPM SA düzeylerinde anlamlı bir değişiklik saptanmadığından, SA'lerin membrana bağlı enzimlerin aksine yaşlanma ile ilişkili dejeneratif olaylardan etkilenmediği düşünülmüştür.

Sonuç olarak; yaşlanma durumunun SPM'a bağlı ATP'az ve AChE aktivitelerinde oluşturduğu inhibisyonun, nöronal eksitotoksitenin ve düşünsel fonksiyon bozukluklarının patogeneğinde önemli bir etken olabileceği ve eksojen MLT'in, yaşlanmanın membrana bağlı transport enzimler üzerindeki depressif etkisini önleyemediğinden, en azından fizyolojik dozlarda yaşlanma karşıtı bir faktör gibi algılanamayacağı kanısına varılmıştır.

SUMMARY

AGE-RELATED CHANGES IN SYNAPTOSOMAL ATPase AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITIES OF POSTNATALLY DEVELOPING RATS TREATED WITH EXOGENOUS MELATONIN

Aging, a multifactorial, degenerative process, attacks the nerve cells of the brain rather broadly. Age-related alterations observed in the brain are defined as the progressive decline in neuronal function, sometimes associated with the neuronal loss. No specific factor leading to aging in the central nervous system (CNS) has been identified. However, experimental findings and clinical data all suggest that pineal gland has a role in the initiation and progression of senescence. Despite the mechanism of action of MLT on the CNS has not been clarified, several studies support a role for this hormone in the regulation of neuronal activity through the modulation of neurotransmitter systems and brain membrane processes. In recent years MLT has been considered as an anti-aging agent. However, it is not known how the progressive deterioration in the morphology and function of the pineal gland during the aging process might affect membrane-bound transport enzymes.

Therefore, this study was planned to investigate the mode of action of the administration of exogenous MLT, an anti-aging and neuroprotectif agent, on synaptosomal transport functions by measuring membrane-bound Na^+, K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase and AChE activities in postnatally developing rats of different ages, thereby clarifying the unknown actions of this neurohormone in nervous system.

weeks, mature-adult 8 to 12 month-old and aged, 20 to 24-month old. To one group of rats of each age, MLT was injected intraperitoneally at a dose of 2 mg/kg body weight (b.wt)/day dissolved in 0.9% saline containing 4% ethanol, for 21 days (15 days to young group). Other groups of animals received vehicle (4% ethanol in normal saline) instead of MLT, served as control groups. At the end of MLT treatment, the animals were sacrificed under light ether anesthesia by cardiac-puncture and synaptosomal membrane (SPM) fractions were obtained from rapidly removed cerebral cortexes. Then Na^+, K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase, AChE activities and sialic acid contents in SPM's were measured.

Na^+, K^+ -ATPase activities in SPM's of young, young-adult and mature-adult control rats were not significantly different while enzyme activity obtained from aged control rat synaptosomes was significantly lower than those obtained from other three age groups. Ca^{2+} -ATPase activity in oldest control rats was also found to be decreased significantly as compared to young and adults groups. Likewise, SPM AChE activities were observed to be decreased from young to aged control rats, reaching the lowest values in 20-24 month-old rats.

Lack of any significant differences in all membrane-bound enzyme activities between vehicle and MLT-treated rats, suggested that physiological doses of exogenous MLT did not have an appreciable effect on these transport enzymes at whichever age groups of rats studied and could not be able to prevent aging-induced enzyme inhibitions.

Unchanged SPM sialic acid contents at different ages of rats treated and untreated with MLT suggested that SA's in contrast to the membrane-bound enzymes were not affected by age-related degenerative processes.

It can be concluded that, aging-induced inhibitions in SPM ATPase and AChE activities may be implicated in the pathogenesis of neuronal excitotoxicity and of age-related disturbances of cognitive functions. In addition, no preventive effect of exogenous MLT treatment on aging induced depression in all membrane-bound transport enzymes led to suggestion that this neurohormone at least, at physiological doses should not be perceived as an anti-aging factor.

KAYNAKLAR

1. **Abbasoğlu, S., Tamer-Toptani, S., Uğurnal, B., Koçak-Toker, N., Aykaç-Toker, G., Uysal M.:** Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in livers and brains of aged rats. *Mech Age Develop* 98:177-180 (1997)
2. **Acuna-Castroviejo, D., Castillo, J. L. , Fernandez, B. , Gomar, M. D. , Del Aguila, C. M.:** Modulation by pineal gland of ouabaine high-affinity binding sites in rat cerebral cortex. *Am. J. Physiol* 262: R 698-R 706 (1992)
3. **Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Macias, M., Hoyos, A.M., Carballo, A.M., Arauzo, M., Montes, R., Vives, F.:** Cell protective role of melatonin in the brain. *J Pineal Res* 19: 57-63 (1995)
4. **Agarwal, S., Sohal, R.S.:** Relationship between susceptibility to protein oxidation, aging and maximum life span potential of different species. *Exp Gerontol* 31:365-372 (1996)
5. **Akbulut, K.G., Gönül, B., Akbulut, H.:** Differential effects of pharmacological doses of melatonin on malondialdehyde and glutathione levels in young and old rats. *Gerontology* 45:67-71 (1999)
6. **Allalouf, D., Komlos, L., Notmann, J., Halbrecht, I., Levinsky, H.:** Sialic acid content and sialyltransferase activity in human lymphocytes with advancing age. *Mech Ageing Dev* 44:45-50 (1988)
7. **Arendt, J., Aldhous, M., Marks, V.:** Alleviation of jet lag by melatonin: Preliminary results of controlled double blind trial. *Brit Med J* 292: 1170 (1986)
8. **Armstrong, S.M., Redman J.R.:** Melatonin: A chronobiotic with anti-aging properties? *Med Hypothesis* 34; 300-309 (1991)
9. **Avis, L.S., Harik, S.I., LaManna, J.C., Wilkerson T., Rosenthal, M.:** Abnormalities of cerebral oxidative metabolism with aging and their relation to the central noradrenergic system. *Gerontology*. 29:248-261 (1983)
10. **Ben-Nathan, D., Maestroni, G.J.M., Conti, A.:** The protective effect of melatonin in viral and bacterial infections. "Therapeutic potential of melatonin", kitabında, Maestroni GJM, Conti A, Reiter RJ (ed). Karger Basel s. 71-80 (1997)

11. **Benzi, G.,** Gorini, A., Arnaboldi, R., Ghigini, B., Villa, R. F.: Age related changes by hypoxia and TRH analogue on synaptic ATPase activities. *Neurobiol. of aging.* 15: 409-417 (1994)
12. **Benzi, G.,** Moretti, A.: Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and glutathione system. *Free Rad Biol Med* 19:77-101 (1995)
13. **Bertorello, A.M.,** Aperia, A., Walaas, S.I., Nairn, A.C., Greengard, P.: Phosphorylation of the catalytic subunit of Na⁺K⁺-ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11359-11362 (1991)
14. **Bhattacharyya, M.L.,** Nathan, R.D., Shelton, V.L.: Release of sialic acid alters the stability of the membrane potential in cardiac muscle. *Life Sci* 29:1071-1078 (1981)
15. **Biessels, G.,** Gispen, W.H.: The calcium hypothesis of brain aging and neurodegenerative disorders: significance in diabetic neuropathy. *Life Sci* 59:379-387 (1996)
16. **Biggs, R.B.,** Booth, F.W.: Protein synthesis rate is not suppressed in red heart during senescence. *Am J Physiol* 258:H207-211 (1990)
17. **Blask, D.E.:** Melatonin in oncology."Melatonin" kitabında, Yu HS, Reiter RJ (ed). CRC Press, Boca Raton S. 447-476 (1993)
18. **Bonting, S.L.,** De Pont JJHM: Mammalian Cell Membranes, Vol. 4, Ed. G.A. Jamieson, D.M., Robinson, s.145-183 Butterworth, London (1977)
19. **Cagnacci, A.,** Volpe, A.: Influence of melatonin and photoperiod on animal and human reproduction. *J Endocrinol Invest* 19: 382-411 (1996)
20. **Cagnacci, A.:** Melatonin in relation to physiology in adult humans. *J Pineal Res* 21:200-213 (1996)
21. **Calderini, G.,** Bonetti, A. C., Battistella. A., Crews, F. T., Toffano, G.: Biochemical changes of rat brain membranes with aging. *Neurochem. Res.* 8: 483-492 (1983).
22. **Campbell:** The dynamics of membrane structure, chapter 11. "Biochemistry" kitabından s 254-271 Saunders college publishing. International edition. (1991)
23. **Carafoli, E.:** Intracellular calcium homeostatis. *Annu Rev Biochem* 56: 395-433 (1987)
24. **Cardinali, D.P.,** Lynch, H.J., Wurtman, R.J.: Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology* 31: 1213-1218 (1972)
25. **Carlsson, A.:** Neurotransmitter changes in the aging brain. *Dan Med Bull.* 32:40-43 (1985)

26. **Caspers, M.L.**, Kwaiser, T.M., Dow, M.J., Fu M-J, Grammas, P.: Control of the Na^+, K^+ -ATPase under normal and pathological conditions. *Mol Chem Neuropath* 19:65-81 (1993)
27. **Cassone, V.M.**, Cheswort, M.L., Amstrong, S.: Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *Physiol Behav* 36: 111-121 (1986)
28. **Castillo-Romero, J.L.**, Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Vives, F.: Age-related changes of neuronal responsiveness to melatonin in the striatum of sham-operated and pinealectomized rats. *J. Pineal Res.* 19:79-86 (1995)
29. **Chen, K.Y.**, Chang, Z.F.: A marked increase of fucosylation of glycoproteins in IMR-90 human diploid fibroblasts during senescence in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 142:767-774 (1987).
30. **Chen, L.**, Chang, M.L.: Effect of dietary vitamin C and vitamin E on respiration and swelling of guinea pig liver mitochondria. *J Nutr* 108: 1616-1620 (1978).
31. **Chen, L.D.**, Tan, D.X., Reiter, R.J., Yaga, K., Poeggeler, B., Kumar, P., Manchester, L.C., Chambers, J.P.: In vivo and in vitro effects of the pineal gland and melatonin on $[\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}]$ dependent ATPase in cardiac sarcolemma. *J Pineal Res* 14:178-183 (1993)
32. **Chen, L.D.**, Kumar, P., Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C., Chambers, J.P., Poeggeler, B., Saarela, S.: Melatonin prevents the suppression of cardiac Ca^{2+} -stimulated ATPase activity induced by alloxan. *Am J Physiol* 267:E57-E62 (1994)
33. **Choi, J.H.**, Yu, B.P.: Brain synaptosomal aging; free radicals and membrane fluidity. *Free Radic Biol Med* 18:133-139 (1995)
34. **Claustrat, B.**, Brun, J., Geoffriau, M. and Chazot, G.: Melatonin: from the hormone to the drug? *Rest Neurol Neurosci* 12:151-157 (1998)
35. **Cotman, C.W.**, Levy W.B.: Membranes in nerve impuls conduction *Biochemistry series one vol.2 Biochemistry of cell wall and membranes* kitabında Edi. CF. Fox Buter worths. London University Park Press. Baltimore s.187-205 (1975)
36. **Cotman, C.W.**, Peterson, C.: Aging in the nervous system 'Basic Neurochemistry' kitabında 4.cü baskı (Ed. Fleischer, S., Packer, L.) s. 382-389 Acad Press New York (1989)
37. **Datta, P.C.**, King, M.G.: Melatonin : Effects on brain and behaviour. *Neurosci Biobehav Res.* 4: 451-458 (1980)
38. **Dawson, D.**, Encel, N.: Melatonin and sleep in humans. *J Pineal Res* 15: 1-12 (1993)

39. **De Smedt, H.,** Parys, J.B., Borghgraef, R., Wuytack, F.: Calmodulin stimulation of renal (Ca^{2+} + Mg^{2+}) ATPase. *FEBS Lett* 131: 60-72 (1981)
40. **De Sousa, B.N.,** Kendirick, Z.V., Roberts J., Baskin, S.I.: Na^{+} - K^{+} -ATPase in rat brain and spinal cord during aging. *Adv. Exp. Med. Biol.* 97: 255-258 (1978)
41. **Demel, R.A.,** De Kruffy, B.: The function of sterols in membranes. *Biochim Biophys Acta* 457:109-132 1976)
42. **Denyy, P.C.,** Denny, P.A., Allerton, S.E.: Determination of sialic acid using 2-thiobarbituric acid in the absence of hazardous sodium arsenite. *Clin Chim Acta.* 131:333-336 (1983)
43. **Dhalla, N.S.,** Zhao, D.: Cell membrane Ca^{2+} / Mg^{2+} ATPase. *Prog Biophys Molec Biol* 52: 1-37 (1988)
44. **Drachman, DA.:** Aging and the brain: a new frontier. *Ann Neurol.* 42:819-828 (1997)
45. **Dulic, V.,** Gafni, A.: Mechanism of aging of rat muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase studied by selective enzyme oxidation. *Mech Ageing Dev* 40:289-306 (1987)
46. **Dunham, E.T.,** Glynn, I.M.: Adenosine triphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. *J Gen Physiol* 156:274-281 (1961)
47. **Dvořáková, L.,** Šťastný, F., Lisý, V.: Relationship between γ -Glutamyl transpeptidase activity and sialic acid content in some organs and brain regions of the developing rat. *Bio Molec Biol Int* 34:1137-1145 (1994)
48. **Ekman, A.:** The acute effects of evening-ingested ethanol on human nocturnal endocrine regulation systems. *Acta Universitatis Ouluensis D Medica* 416 S: 18 Oulun Yliopisto, Oulu (1997)
49. **Ellman, G.L.,** Courtney, K.D., Andres V. Jr, Featherston, R.M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95 (1961)
50. **Farooqui, A.A.,** Hraishima, Y., Farooqui, T., Horrocks, L.A.: Involvement of calcium, lipolytic enzymes and free fatty acids in ischemic brain trauma. *Neurochem Correlates of Cerebral Ischemia* kitabında (editör Bazan, N.G., Braquet, P., and Ginsberg, M.D.) sayfa 117-138, Plenum, New York 1992.
51. **Feldman, R.D.,** Linnbird, L.E., Nadeau, J., Robertson, D., Wood, A.J.J.: Alterations in leukocyte beta-receptor affinity with ageing. A potential explanation for altered beta-adrenergic sensitivity in the elderly. *New Engl J Med* 310:815-819 (1984)
52. **Fernstrom, J.D.,** Wurtman, R.J.: Brain serotonin content. Physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science* 178:414- 416 (1972)

53. **Finocchiaro, L.M.,** Polack, E., Nahmod, V.E., Glikin, G.C.: Sensitivity of human peripheral blood mononuclear leukocytes to visible light. *Life Sci* 57:1097-1110 (1995)
54. **Firth, J.A.,** Stranks, G.J.: Localization of recently characterized membrane transport adenosine triphosphatases. *Histochem J* 13: 517-524 (1981)
55. **Folbergrova, J.:** The effect of vanadate on Na^+/K^+ -ATPase activity of mouse cerebral cortex during bicuculline-induced seizures. *Brain Res* 363:53-61 (1986)
56. **Gafni, A.:** Structural modifications of proteins during aging. *J Am Geriatr Soc* 45:871-880 (1997)
57. **Garcia-Martin, E.,** Gutierrez-Merino, C.: Local anesthetics inhibit the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of rat brain synaptosomes. *J Neurochem* 47: 668-672 (1986)
58. **Garner, M.H.,** Bahador, A., Sachs, G.: Nonenzymatic glycation of Na_2K -ATPase. *J Biol Chem* 267:15058-15066 (1990)
59. **Gilbert, J.C.,** Wyllie, M.G.: Effects of anticonvulsant and convulsant drugs on the ATPase activities of synaptosomes and their components. *Br J Pharmacol* 56:49-57 (1976)
60. **Ginsberg, B.H.,** Jabour, J., Spector, A.A.: Effect of alterations in membrane lipid unsaturation on the properties of the insulin receptor of Ehrlich ascites cells. *Biochim Biophys Acta* 690:157-64 (1982)
61. **Giusti, P.,** Lipartiti M., Franceschini, D., Schiavo, N., Floreani, M., Manev, H.: Neuroprotection by melatonin from kainate-induced excitotoxicity in rats. *FASEB J* 10:891-896 (1996)
62. **Goldstein, D.B.,** Israel, Y.: Effects of ethanol on mouse brain (Na-K)-activated adenosine triphosphatase. *Life Sci* 11:957-963 (1972)
63. **Grad, B.R. and** Rozencwaig, R.: The role of melatonin and serotonin in aging: Update. *Psychoneuroendocrinology* 18: 283-295 (1993)
64. **Hakim, G.,** Itana, T., Verma, A.K., Penniston, J.T.: Purification of the Ca^{2+} ATPase from rat brain synaptic plasma membrane. *Biochem J* 207: 225-231 (1982)
65. **Hanahisa, Y.,** Yamaguchi, M.: Increase of Ca^{2+} -ATPase activity in the brain microsomes of rats with increasing ages: involvement of protein kinase C. *Brain Res Bull* 46:329-332 (1998)
66. **Hardeland, R.,** Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.X.: The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 17: 347-357 (1993)

67. **Harman, D.:** Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol* 11:298-300 (1956)
68. **Harman, D.:** Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs Aging* 3:60-80 (1993)
69. **Hartmann, H., Eckert, A., Muller, W.E.:** Disturbances of the neuronal calcium homeostasis in the aging nervous system. *Life Sci* 55:2011-2018 (1994)
70. **Hattori, N., Kitagawa, K., Higashida, T., Yagyu, K., Shimohama, S., Wataya, T., Perry, G., Smith, M., Inagaki, C.:** Cl^- ATPase and Na^+/K^+ -ATPase activities in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett* 254:141-144 (1998)
71. **Hebbel, R.P., Shalev, O., Foker, W., Rank, B.H.:** Inhibition of erythrocyte Ca^{2+} ATPase by activated oxygen through thiol-and lipid dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 862: 8-12 (1986)
72. **Hegner, D., Platt, D.:** Effect of essential phospholipids on the properties of ATPase of isolated rat liver plasma membranes of young and old animals. *Mech Ageing Dev* 4:191-200 (1975)
73. **Hegner, D., Platt, D., Heckers, H., Schloeder, U., Breuniger, V.:** Age-dependent physiological and biochemical studies of human red cell membranes. *Mech Ageing Dev* 10:117-130 (1979)
74. **Hegner, D.:** Age-dependence of molecular and functional changes in biological membrane properties. *Mech Ageing Dev* 14:101-118 (1980)
75. **Henden, T., Stokkan, K.A., Reiter R.J., Nonaka, K.O., Lerchl, A. and Jones, D.J.:** The age-associated reduction in pineal β -adrenergic receptor density is prevented by life-long food restriction in rats. *Biol Signals* 1:34-39 (1992)
76. **Hernández, R.J.:** Effects of malnutrition and quipazine on rat cerebral cortex ATPase activity during development. *Dev Neurosci* 3:277-282 (1980)
77. **Hocman, G.:** Biochemistry of ageing. *Int J Biochem* 10:867-876 (1979)
78. **Hollander, J., Barrows, C.Jr.:** Enzymatic studies in senescent rodent brain. *J. Gerontol.* 23:174-179 (1968)
79. **Hosie, R.T.A.:** The localization of adenosine triphosphatase in morphologically characterized fractions of guinea-pig brain. *Biochem J* 96:404-412 (1976)
80. **Huerto-Delgadillo, L., Anton-Tay, F., Benitz-King, G.:** Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res* 13: 55-62 (1992)
81. **Huether, G.:** Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact of nutritional factors on circulating melatonin *Ann N.Y. Acad Sci* 719:146-158 (1994)

82. **Hussain, S., Slikker JR,W., Ali, S.F.:** Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int J Devl Neurosci* 13:811-817 (1995)
83. **Ianas, O., Olnescu, R., Badescu, I.:** Melatonin involvement in oxidative stress. *Rom J Endocrinol* 29: 149-153 (1991)
84. **Iguchi, H., Kato, K.I., Ibayashi, H.:** Age-dependent reduction in serum melatonin concentrations in healthy human subjects. *J Clin Endocriol Metab* 55:27-29 (1982)
85. **James, T.C., Kanungo, M.S.:** Alteration in atropine sites of the brain of rats as a function of age. *Biochem Biophys Res Commun* 72:172- 175 (1976)
86. **Jinna, R.R., Uzodinma, J.E., Desai, D.:** Age-related changes in rat brain ATPase during treatment with chlordecone. *J Toxicol Environ Health* 27:199-208 (1989)
87. **Kadlubowski, M., Agutter, P.:** Changes in the activities of some membrane-associated enzymes during in vivo aging of the normal human erythrocyte. *Br J Haematol* 37:111-125 (1977)
88. **Kendrick, N.C., Blaustein, M.P., Fried R.C., Ratzlaff, R.W.:** ATP-dependent calcium storage in presynaptic nerve terminals. *Nature* 265:246-248 (1977)
89. **Kendrick, Z.V., Goldfarb, A.H., Roberts, J., Baskin, S.:** The effect of age on the activity and ouabain inhibition of Na^+, K^+ -ATPase purified from tissues of the Fischer 344 rat. *Neural Regulatory Mechanisms During Aging* 1:223-225 (1980)
90. **Kennedy, R., Akera, T., Katona, Y.:** Aging: effects on sodium-and potassium-activated adenosine triphosphatase activity and ouabain binding sites in rat brain. *J. Gerontol.* 40: 401-408 (1985)
91. **Kirkland, J.L.:** The biochemistry of mammalian senescence. *Clin Biochem.* 25:61-75 (1992)
92. **Knight, J.A.:** Free radicals: Their history and current status in aging and disease. *Ann Clin and Lab Sci.* 28:331-346 (1998)
93. **Kyte, J.E.:** Physiological consequences of the cellular distribution of sodium-plus-potassium ion dependent adenosine triphosphatase. *Biochim Soc Trans* 6: 833-836 (1978)
94. **Lajeunesse, D., Carriere, B., Giocondi, M.C., Grimellec, L.:** Modification of physicochemical properties of rat kidney brush border membrane upon ageing. *Kidney Intern* 25:306 (1984)
95. **LaManna, J.C., Doull, G., McCracken, K., Harik, S.I.:** $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -ATPase activity and ouabain-binding sites in the cerebral cortex of young and aged Fischer-344 rats. *Gerontology.* 29:242-247 (1983)

96. **Leong, S.,** Lai, J., Lim, L., Clark, J.: Energy-metabolizing enzymes in brain regions of adult and aging rats. *J Neurochem* 37:1548-1556 (1981)
97. **Leong, S.F.,** Leung, T.K.C.: Diabetes induced by streptozotocin causes reduced $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase in the brain. *Neurochem Res* 16:1161-1165 (1991)
98. **Lerner, A.B.,** Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H., Mori, W.: Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 80:2587 (1958)
99. **Liebmann, P.M.,** Wölfler, A., Felsner, P., Hofer, D., Schauenstein, K.: Melatonin and the immune system. *Int Arch Allergy Immunol* 112: 203-211 (1997)
100. **Lin, J.Y.,** Chadee, K.: Macrophage cytotoxicity againsts entomoeba histolytica trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 141: 3999-4004 (1992)
101. **Liu, R-Y.,** Zhou, J-N., Van Heerikhuize, J., Hofman, M.A., Swaab, D.F.: Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and apolipoprotein E-ε4/4 genotype. *J Clin Endoc Met* 84:323-327 (1999)
102. **Lothman, E.,** LaManna, J., Cordingley, G., Rosenthal, M., Somjen, G.: Responses of electrical potential, potassium levels, and oxidative metabolic activity of the cerebral neocortex of cats. *Brain Res.*88:15-36 (1975)
103. **Lounay, J.M.,** Lamaitre, B.J., Husson, H.P., Dreux, C., Hartmann, L., Da-Prada, M.: Melatonin synthesis by rabbit platelets. *Life Sci* 31:1487-1494 (1982)
104. **Lowry, O.H.,** Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275 (1951)
105. **Mandavilli, B.S.,** Rao, K.S.: Neurons in the cerebral cortex are most susceptible to DNA-damage in aging rat brain. *Biochem Mol Biol Int.* 40:507-514 (1996)
106. **Margolis, R.K.,** Margolis, R.U.: Distribution and characteristics of polysialosyl oligosaccharides in nervous tissue glycoproteins. *Biochem Biophys Res Com.* 116:889-894 (1983)
107. **Martin, G.R.,** Danner. D.B., Holbrook, N.J.: Aging-causes and defenses. *Annu Rev Med* 44:419-429 (1993)
108. **Martinez-Cayuela, M.:** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 77:147-161 (1995)
109. **Masoro, E.J.:** Biology of disease. Biology of aging. Facts, Thoughts and experimental approaches. *Lab Invest.* 65:500-510 (1991)
110. **McEntee, W.J.,** Crook, T.H.: Cholinergic function in the aged brain: implications for treatment of memory impairments associated with aging. *Behav Pharmacol.* 3:327-336 (1992)

111. **Melchiorri, D.**, Reiter, R.J., Chen, L.D., Sewerynek, E., Nistico, G.: Melatonin affords protection against kainate-induced in vitro lipid peroxidation in brain: *Eur J Pharmacol* 305: 239-242 (1996)
112. **Meneguz, A.**, Guillermo, M.B., Michalek, H.: Age-related changes in acetylcholinesterase and its molecular forms in various brain areas of rats. *Neurochem. Res.* 17: 785-790 (1992)
113. **Michaelis, E.K.**, Michaelis, M.L., Chang, H.H., Kitos, T.E.: High affinity Ca^{2+} -stimulated Mg^{2+} -dependent ATPase in rat brain synaptosomes, synaptic membranes and microsomes. *J Biol Chem* 258: 6101-6108 (1983)
114. **Michaelis, M.L.**, Michaelis E.K.: Functional parameters of ATPases from brain subcellular membranes. 'Membrane transport and information storage' kitabında Alan R. Liss, Inc. s:133-163 (1990)
115. **Miguez, J.M.**, Recio, J., Sanchez-Barcelo, E., Aldegunde, M.: Changes with age in daytime and nighttime contents of melatonin, indoleamines, and catecholamines in the pineal gland: A comparative study in rat and Syrian hamster. *J Pineal Res* 25:106-115 (1998)
116. **Moake, J.L.**, Ahmed, K., Bachur, N.R., Gutfreund D.R.: Mg-dependent, $(\text{Na}^{+}\text{-K}^{+})$ stimulated ATPase of human platelets. *Biochem Biophys Acta* 221:337-344 (1970)
117. **Monnier, V.M.**, Miyata, S., Nagaraj, R.H., Sell, D.R.: Relevance of the early and advanced Maillard reaction in diabetic neuropathy. *Diabet Med* 10:103S-106S (1993)
118. **Morrey, K.M.**, Mc Lacklan, J.A., Serkin, C.D., Bakouche, O.: Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol* 153: 2677-2680 (1994).
119. **Mortensen, S.R.**, Hooper, M.J., Padilla, S.: Rat brain acetylcholinesterase activity: Developmental profile and maturational sensitivity to carbamate and organophosphorus inhibitors. *Toxicol* 125:13-19 (1998)
120. **Mourek, J.**, Trojanová, M., Štastný, F.: Effect of repeated fasting on ATPase activities in the brain of rats different ages. *Physiol Bohemoslov* 30:335-340 (1981)
121. **Mrak, R.E.**, Griffin, W.S.T., Graham, D.I.: Aging-associated changes in human brain. *J Neuropath Exp Neurol* 56:1269-1275 (1997)
122. **Munch, G.**, Thome, J., Foley, P., Schinzel, R., Riedere, P.: Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 23:134-143 (1997)
123. **Nathan, R.D.**, Fung, S.J., Stocco, D.M., Barron, E.A., Markwald, R.R.: Sialic acid: regulation of electrogenesis in cultured heart cells. *Am J Physiol* 239:197-207 (1980)

124. **Nhamburo, P.T.,** Salafsky, B.P., Tabakoff, B., Hoffman, P.L.: Effects of ethanol on ouabain inhibition of mouse brain (Na^+ , K^+) ATPase activity. *Biochem Pharmacol* 36:2027-2033 (1987)
125. **Nishimura, M.,** Kozaki, S., Sakaguchi, G., Yagasaki, O., Yanagiya, I.: The role of sialic acid in the nerve terminal for the release of transmitter. *Life Sci* 35:2435-2441 (1984)
126. **Nokubo, M.:** Physical, chemical and biochemical differences in liver plasma membranes in aging F344 rats. *J Gerontol* 4:409-414 (1985)
127. **Norman, A.W.,** Litwack G.: *Hormones*, New York: Academic, s.710., 1987
128. **Öner, P.,** Öztaş, B., Koçak, H.: Brain cortex Na^+ - K^+ ATPase activities in streptozotocin-diabetic and pentylenetetrazol-epileptic rats. *Pharmacol Res* 36:69-72 (1997)
129. **Panfoli, L.,** Mustane, A., Morelli, A., Thellung, S., Cupello, A.: Ca^{2+} -ATPase pump forms and an endogenous inhibitor in bovine brain synaptosomes. *Neurochem Res* 22: 297-304 (1997)
130. **Papazian, D.M.,** Rahamimoff, H., Goldin, S.M.: Partial purification and functional identification of a calmodulin-activated adenosine 5'-triphosphate-dependent calcium pump from synaptic plasma membranes. *J Neurosci* 4: 1933-1943 (1984)
131. **Partonen, T.:** Short Note: Melatonin-dependent infertility. *Med Hypotheses* 52:487-488 (1999)
132. **Pierpaoli, W.,** Dall'ara, A., Pedrinis, E., Regelson, W.: The pineal control of aging: The effects of melatonin and pineal grafting on the survival of older mice. *Ann N.Y. Acad Sci* 620:291-313 (1991)
133. **Pierrefiche, G. and** Laborit, H.: Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol* 30:213-227 (1995)
134. **Platt, D.,** Norwig, P.: Biochemical studies of membrane glycoproteins during red cell aging. *Mech Ageing Dev* 14:119-126 (1980)
135. **Poeggeler, B.,** Reiter, R.J., Tan, D.X., Chen, L.D., Manchester, L.C.: Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage and aging: a hypothesis. *J Pineal Res* 14:151-168 (1993)
136. **Poeggeler, B.,** Saarela, S., Reiter, R.J., Tan, D.X., Chen, L.K., Manchester, L.C., Barlow-Walden, L.R.: Melatonin a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: New aspects of the oxidation chemistry of this indol assased in vivo. *Ann NY Acad Sci* 738: 419-420 (1994)

137. **Poehlman, E.T., Toth, M.J., Webb, G.D.:** Sodium-Potassium pump activity contributes to the age-related decline in resting metabolic rate. *J Clin Endocrinol Metab* 76:1054-1057 (1993)
138. **Poon, A.M.S., Pang, S.F.:** Modulation of [125 I] iodomelatonin binding sites in the guinea pig spleen by melatonin injection is dependent on the dose and period but not the time. *Life Sci* 54: 1411-1418 (1994)
139. **Pradham, S.N.:** Central neurotransmitters and aging. *Life Sci.* 26:1643-1656 (1980)
140. **Provinciali, M., Stefano, G.D., Bulian, D., Stronati, S., Fabris, N.:** Long-term melatonin supplementation does not recover the impairment of naturel killer cell activity and lymphocyte proliferation in aging mice. *Life Sci* 61:857-864 (1997)
141. **Qin, Z., Zaidi, A., Gao, J., Krainew, A.G., Michaelis, M.L., Squier, T.C., Bigelow, D.J.:** Decrease in Ca^{2+} -ATPase activity in aged synaptosomal membranes is not associated with changes in fatty acyl chain dynamics. *Mech Ageing Dev* 105:291-300 (1998).
142. **Rangaraj, N., Kalant, H.:** Effect of chronic ethanol treatment on temperature dependence and on norepinephrine sensitization of rat brain ($\text{Na}^{+}+\text{K}^{+}$)- adenosine triphosphatase. *J Pharmacol Exp Ther* 223:536-539 (1982)
143. **Rangaraj, N.I., Kalant, H.:** Effect on ethanol tolerance on norepinephrine-ethanol inhibition of ($\text{Na}^{+}+\text{K}^{+}$)Adenosine Triphosphatase in various regions of rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 231:416-421 (1984)
144. **Rao, K.S.P., Rao, S.B., Camus, P.H., Mehendale, H.M.:** Effect of amiodarone on $\text{Na}^{+},\text{K}^{+}$ ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities in rat brain synaptosomes. *Cell Biochem Func* 4:143-151 (1986)
145. **Rawat, A.K.:** Ribosomal protein synthesis in the fetal neonatal rat brain as influenced by maternal ethanol consumption. *Res Com Chem Pathol Pharmacol* 12: 723-732 (1975)
146. **Rawn, J.D.:** Molecular biology of the cell, Parts six, Chapter 31. Biological membrane transport, Chapter 32. Transmission of nerve impulse and signal transduction in sensory systems. 'Biochemistry' kitabinda Neil Patterson Publishers, Carolina Biological Supply Company Burlington, North Carolina s.1021-1076 (1989)
147. **Ray, J.E., Ray, E.K., Baskin, S.I.:** Effects of age on lipid and sensitivity of $\text{Na}^{+},\text{K}^{+}$,-ATPase to Ouabain in rat spinal cord. *Age* 6:58-61 (1983)
148. **Reiter, R.J.:** Comparative physiology: pineal gland. *Ann Rev Physiol* 35: 305-328 (1973)

149. **Reiter, R.J.**, Johnson, L.Y., Steger, R.W., Richardson, B.A., Petterborg, L.J.: Pineal biosynthetic activity and neuro-endocrine physiology in the aging hamster and gerbil. *Peptides (Suppl.1)* 1:69-77 (1980)
150. **Reiter, R.J.**, Craft, C.M., Johnson, J.E., JR., King, T.S., Richardson, B.A., Vaughan, G.M., Vaughan, M.K.: Age-associated reduction in nocturnal melatonin levels in female rats. *Endocrinology* 109:1295-1297 (1981)
151. **Reiter, R.J.**: Normal pattern of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals. *J Neurol Transm* 21: 35-54 (1986)
152. **Reiter, R.J.**: Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 12:151-180 (1991)
153. **Reiter, R.J.**: Pineal function during aging: Attenuation of the melatonin rhythm and its neurobiological consequences. *Acta Neurobiol Exp Suppl* 54: 31-39 (1994)
154. **Reiter, R.J.**: Oxidative process and antioxidative defence mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 9: 526-533 (1995)
155. **Reiter, R.J.**: Oxygen radical detoxification processes during aging: The functional importance of melatonin. *Aging Clin Exp Res* 7:340-351 (1995)
156. **Reiter, R.J.**: The pineal gland and melatonin in relation to aging: A summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol* 30:199-212 (1995)
157. **Reiter, R.J.**: The role of neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage-commentary. *Neurochem Int* 27: 453-460 (1995)
158. **Reiter, R.J.**: Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. *Eur J Endocrinol* 134: 412-420 (1996)
159. **Reiter, R.J.**: Aging and oxygen toxicity: relation to changes in melatonin. *Age* 20:201-213 (1997)
160. **Reiter, R.J.**, Guerrero, J.M., Garcia, J.J., Acuna-Castroviejo, D.: Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging relation to melatonin. *Ann N.Y. Acad Sci* 20:410-424 (1998)
161. **Reiter, R.J.**: Cytoprotective properties of melatonin: Presumed association with oxidative damage and aging. *Nutrition* 14:691-696 (1998)
162. **Reppert, S.M.**, Weaver, D.R., Ebisawa, T.: Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian response. *Neuron* 13: 1177-1185 (1994)
163. **Rosenthal, M.**, LaManna, J.: Effect of ouabain and phenobarbital on the kinetics of cortical metabolic transients associated with evoked potentials. *J Neurochem* 24:111-116 (1975)

164. **Rossier, B.C.,** Geering, K., Kraehenbuhl, J.P.: Regulation of the sodium pump: How and why? *TIBS* 12:483-487 (1987)
165. **Roth, G.J.,** Siok, C.J.: Acetylation of the NH₂-terminal serine of prostaglandin synthetase by the aspirin. *J Biol Chem* 253:3782-3784 (1978)
166. **Sack, R.L.,** Lewy, A.J., Erb, D.L., Vollmer, W.M., Singer, C.M.: Human melatonin production decreases with age. *J Pineal Res* 3:379-388 (1986)
167. **Saez-Valero, J.,** Tornel, P.L., Muñoz-Delgado, E., Vidal, C.J.: Amphilic and hydrophilic forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human brain. *J Neurosci Res* 35:678-689 (1993)
168. **Sanders, D.C.,** Chaturvedi, A.K., Hordinsky, J.R.: Melatonin: Aeromedical, toxicopharmacological, and analytical aspects. *J Anal Toxicol* 23:159-167 (1999)
169. **Santos, D.L.,** Lopes, M.C., Carvalho, C.M.: Calcium channel blockers inhibit the (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase activity and the ¹²⁵I calmodulin binding in brain membranes. *Eur J Pharmacol* 267: 307-316 (1994)
170. **Sawas, A.H.,** Gilbert, C.: The effects of dopamine agonists and antagonists on Na⁺,K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase activities of synaptosomes. *Biochem Pharmacol* 31:1531-1533 (1982)
171. **Schauer, R.:** Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 40:131-234 (1982)
172. **Scheider, E.L.:** Theories of aging: a perspective in: M.R. Warner, R.N., Butler, R.L., Sprott and E.Schneider (Eds) *Modern Biologic Theories of Aging*, Raven Press, New York N.Y. s.:1-4 (1987)
173. **Schmidt, T.A.,** Larsen, J.S., Kjeldsen, K.: Quantification of rat cerebral cortex Na⁺-K⁺-ATPase : Effect of age and potassium depletion . *J. Neurochem.* 59: 2094 - 2104 (1992)
174. **Schmitt, C.A.,** McDonough, A.A.: Developmental and thyroid hormone regulation of two molecular forms of Na⁺-K⁺-ATPase in brain. *J Biol Chem* .261:10439-10444 (1986)
175. **Schmitz, M.M.,** Sepandj, A., Pichler, P., Rudas, S.: Distrupted melatonin-secretion during alcohol withdrawal. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatr* 20: 983-995 (1996)
176. **Sewerynek, E.,** Melchiorri, D., Chen, L.D., Reiter, R.J.: Melatonin reduces both basal and lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro. *Free Radic Biol Med* 19: 903-909 (1995)

177. Sewerynek, E., Reiter, R.J., Melchiorri, D., Ortiz, G.G., Lewinski, A.: Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: Protection by melatonin. *Hepato-Gastroenterology* 43: 898-905 (1996)
178. Shull, G.E., Schwartz, A., Lingrell, J.B.: Aminoacid sequence of the catalytic subunit of the (Na⁺,K⁺)-ATPase deduced from a complementary DNA *Nature* 316:691-695 (1985)
179. Singer, S., Nicolson, G.L.: The fluid-mosaic model of structure of cell membranes. *Science* 175:720-731 (1972)
180. Skau, K.A., Triplett, C.G.: Age-related changes in activity of Fischer 344 rat brain acetylcholinesterase molecular forms. *Mol Chem Neuropathol* 35:13-21 (1998)
181. Skou, J.C.: The influence of some cations on the adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochem Biophys Acta* 23:394-401 (1957)
182. Skou, J.C.: Enzymatic basis of active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane, *Physiol Rev* 45:596-617 (1965)
183. Skou, J.C.: Overview. The Na,K-pump. 'Methods in Enzymology' kitabında Vol.156 s.1-25 Academic Press Inc. (1988)
184. Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A., Markesbery, W.R.: Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10540-10543 (1991)
185. Smith, J., Pereira-Smith, O.: Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science* 273:63-67 (1996)
186. Srikanth, N.S., Seth, P.K., Desai, D.: Inhibition of calmodulin-activated Ca²⁺-ATPase by endosulfan in rat brain. *J Toxicol Environ Health* 28:473-481 (1989)
187. Stäbelin, B.H.: The impact of antioxidants on chronic disease in ageing and in old age. *Int J Vitam Nutr Res* 69:146-149 (1999)
188. Stavridis, J.C.: Correlation between activities of Na⁺-K⁺-ATPase and acetylcholinesterase in postnatally developing rat brain. *Med Sci Res* 24: 155-156 (1996)
189. Steiner, M., Vancura, S.: Asymmetrical loss of sialic acid from membrane glycoproteins during platelet aging. *Thrombosis Res* 40: 465-471 (1985)
190. Stokkan, K.A., Reiter, R.J., Nonaka, K.O., Lerchl, A., PalYu, B., Vaughan, M.K.: Food restriction retards aging of the pineal gland. *Brain Res* 545:66-72 (1991)
191. Sugden, D.: Circadian changes in rat pineal tryptophan content: Lack of correlation with serum tryptophan. *J Neurochem* 33:811-813 (1979)

192. **Sun, G.Y., Sun, A.Y.:** Synaptosomal plasma membranes: acyl group composition of phosphoglycerides and Na^+, K^+ -ATPase activity during fatty acid deficiency. *J Neurochem* 22:15-18 (1974)
193. **Sylvia, A., Harik, S., LaManna, J., Rosenthal, M.:** Influence of age and endogenous norepinephrine on oxidative metabolic responses to electrical stimulation of rat cerebral cortex in situ. *Neuroscience* 7:185 (1981)
194. **Tang, F., Hadjiconstantinou, M., Pang, S.F.:** Aging and diurnal rhythms of pineal serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, norepinephrine, dopamine and serum melatonin in the male rat. *Neuroendocrinol* 40:160-164 (1985)
195. **Taubes, G.:** Misfolding the way to disease. *Science* 271:1493-1495 (1996)
196. **Tauc, L., Hinzen, D.:** Neuraminidase-Its effect on synaptic transmission. *Brain Res* 80:340-344 (1974)
197. **Taussky, H.H., Shorr, E.:** A micro colorimetric method for determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem.* 202:675-685 (1953)
198. **Taylor, J.L., Mayer, R.T., Himel, C.M.:** Conformers of acetylcholinesterase: A mechanism of allosteric control. *Mol Pharmacol* 45:74-83 (1993)
199. **Terayama, K., Muratsugu, M.:** Effects of lead on sialic acid content and survival of rat erythrocytes. *Toxicology* 53:269-276 (1988)
200. **Touitou, Y., Fevre, M., Laguguey, M., Carayon, A., Boydon, A., Reinhert, A.:** Age and mental health related circadian rhythms of plasma levels of melatonin, prolactin, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone. *J. Endocrinol.* 91:367-375 (1981)
201. **Touitou, Y., Bogdan, A., Auzéby, A., Selmaoui, B.:** Mélatonine et vieillissement. *Thérapie* 53:473-478 (1998)
202. **Tsakiris, S., Angelogianni, P., Stavridis, J.C.:** Correlation between activities of Na^+, K^+ -ATPase and acetylcholinesterase in postnatally developing rat brain. *Med Sci Res* 24:155-156 (1996)
203. **Tsakiris, S., Angelogianni, P., Stavridis, J.C.:** Effect of aging on the activities of acetylcholinesterase, Na^+, K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase in rat pituitary and hypothalamus. *Z. Naturforsch.* 53c:168-172 (1998)
204. **Uz, T., Guisti, P., Franceschini, D., Kharlamov, A., Manev, H.:** Protective effect of melatonin against hippocampal DNA damage induced by intraperitoneal administration of kainate to rats. *Neuroscience Lett* 73:631-636 (1996)
205. **Vijg, J.:** Searching for the molecular basis of aging; the need for life extension models. *Aging* 2:227-229 (1990)

206. **Waldhauser, F.,** Weiszenbacher, G., Tatzer, E., Gisinger, B., Waldhauser, M., Schemper, M., Frisch, H.: Alterations in nocturnal serum melatonin levels in human with growth and aging. *J Clin Endocrinol Metab* 66:648-652 (1988)
207. **Waldhauser, F.,** Ehrhart, B., Förster, E.: Clinical aspects of the melatonin action: Impact on development, aging and puberty, involvement of melatonin in psychiatric diseases and importance of neuroimmunoendocrine interactions. *Experientia* 49:671-681 (1993)
208. **Waldhauser, F.,** Kovács, J., Reiter, E.: Age-related changes in melatonin levels in humans and its potential consequences for sleep disorders. *Exp Gerontol* 33:759-772 (1998)
209. **Warner, H.R.:** Superoxide dismutase, aging and degenerative disease. *Free Rad Biol Med* 17:249-258 (1994)
210. **Wheeler, K.P.,** Walker, J.A. and Barker, D.M.: Lipid requirement of the membrane sodium-plus-potassium ion-dependent adenosine triphosphatase system. *Biochem J* 146:713-722 (1975)
211. **Wu, P.H.,** Phillis, J.W.: Noradrenaline stimulation of (Na⁺,K⁺)ATPase in homogenates of the developing rat brain. *Biochem Pharmacol* 30:2368-2370 (1981)
212. **Yamakawa, T.,** Nagai, Y.: Glycolipids at the cell surface and their biological functions. *Trends Biochem Sci* 3:128-131 (1978)
213. **Yamauchi, M.,** Woodley, D.T., Mechanie, G.L.: Aging and cross-linking of skin collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 152:898-903 (1988)
214. **Zaidi, A.,** Gao, J., Squier, T.C., Michaelis, L.: Age-related decrease in brain synaptic membrane Ca²⁺-ATPase in F344/BNF1 rats. *Neurobiol Aging* 19:487-495 (1998)
215. **Zaidi, A.,** Michaelis, M.L.: Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca(2)-ATPase. *Free Radic Biol Med* 27:810-821 (1999)
216. **Zhang, Z.,** Insera, P.F., Liang, B., Ardestani, S.K., Elliott, K.K., Molitor, M., Watson, R.R.: Melatonin, immune modulation and aging. *Autoimmunity* 26:43-53 (1997)
217. **Zhdanova, I.V.,** Wurtman, R.J., Balcioğlu, A., Kartashov, A.I., Lynch, H.J.: Endogenous melatonin levels and the fate of exogenous melatonin: Age effects 53:293-298 (1998)



ÖZGEÇMİŞ

1968 yılında Ankara'da doğdum. 1985 yılında Ankara Keçiören Lisesini, 1991 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünü bitirdim ve aynı yıl İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladım. 1993 yılında " Sağlıklı insanlarda eritrosit membranı Na^+ - K^+ ATPaz ve Ca^{2+} -ATPaz aktivitelerine ve sialik asit düzeylerine yaşlanmanın etkisi" adlı tez ile yüksek lisans derecesini aldım. 1993 yılında İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açtığı Biyokimya doktora sınavını kazandım. Evliyim ve bir kızım var.

