

150124

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

150124

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN DİYABETİK RATLARDA
HİPOKAMPUS VE BEYİN KORTEKSİNDE N-CAM PROTEİN
EKSPRESYONU VE BUNA MELATONİN VE VİTAMİN E’NİN ETKİSİ**

Mehmet TUZCU

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

ELAZIĞ, 2004

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN DİYABETİK RATLARDA
HİPOKAMPUS VE BEYİN KORTEKSİNDE N-CAM PROTEİN
EKSPRESYONU VE BUNA MELATONİN VE VİTAMİN E'NİN ETKİSİ

Mehmet TUZCU

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 08.10.2004 tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği ile başarılı olarak değerlendirilmiştir.

Danışman: Prof.Dr. Gıyasettin BAYDAŞ

Üye : Prof.Dr. Ahmet ŞAHİN

Üye : Prof.Dr. Ferit GÜRSU

Üye : Yrd.Doç.Dr. Ökkeş YILMAZ

Üye : Yrd.Doç.Dr. Songül AYDEMİR

Bu tezin kabulü , Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 22/10/2004 tarih ve 2004/42-3 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime bilgi ve tecrübeleri ile katkıda bulunan, tezimin hazırlanmasında yardım ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof.Dr. Gıyasettin BAYDAŞ'a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince yardımlarını gördüğüm Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Abdullah YAŞAR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca doktora çalışmalarım süresince manevi desteklerini hissettiğim Bölüm Başkanımız Prof.Dr. Ahmet ŞAHİN ve Bölümümüz Öğretim Elemanlarına; Laboratuvar imkanlarından yararlandığım Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Elemanlarına; Doktora eğitimime katkıda bulunan Harran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı Doç.Dr. Nihat DİLSİZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarına FÜBAP-732 nolu projeyle maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Birimine katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	I
ŞEKİLLER LİSTESİ	III
TABLolar	IV
KISALTMALAR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
1.GİRİŞ	1
1.1. HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİ	1
1.1.1. Nöral Hücre Adezyon Moleküllerinin Yapısı ve Özellikleri	3
1.1.2. Öğrenme ve Hafızanın Şekillenmesinde Nöral Hücre Adezyon Moleküllerinin Rolü	5
1.1.3. Sinir Sistemi Hastalıkları ile Nöral Hücre Adezyon Moleküllerinin İlişkisi	6
1.1.4. Sinaptik Plastisite	6
1.1.5. Sinaptik Plastisite ve PSA-NCAM	7
1.1.6. Sinaptik Plastisite ve LTP	9
1.1.2. HİPOKAMPUS	9
1.3. KORTEKS	11
1.4. ÖĞRENME ve BELLEK	12
1.5. DİABETES MELLİTUS	13
1.5.1. Deneysel Diyabet ve Serbest Radikaller	15
1.5.2. Diyabetik Ratlarda Öğrenme Eksiklikleri	17
1.5.3 Oksidatif Stresin Hafıza ve Öğrenmeye Etkisi	17
1.6. MELATONİN	18
1.6.1. Melatoninin Salınım Kontrol Mekanizmaları ve Sentezi	18
1.6.2. Melatoninin Yaşla İlişkisi	19
1.6.3. Melatoninin Sinir Sisteminde ve Kanda Dolaşımı	20
1.6.4. Melatoninin Serbest Radikal Giderici Antioksidan Etkisi	21
1.7. VİTAMİN E	22
2. MATERYAL ve METOD	25
2.1. Deney Hayvanları	25
2.2. Deneysel Uygulamalar	25

2.3. Hipokampus ve Korteks Örneklerinin Alınması	26
2.4. Hipokampus ve Korteks Örneklerinin Hazırlanması	27
2.5. Hipokampus ve Korteks Örneklerinde Lipit Peroksidasyonu (LPO) Ölçüm Yöntemi	27
2.6. Hipokampus ve Korteks Örneklerinde Glutasyon (GSH) Ölçüm Yöntemi	28
2.7. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	29
2.7.1. Hipokampus ve Korteks Örneklerinin SDS-PAGE ile Analizi	31
2.8. Western Blot	32
2.8.1. Hipokampus ve Korteks Örneklerinin Western Blot ile Analizi	33
2.9. İstatistiksel Metod	34
3. BULGULAR	35
4. TARTIŞMA	41
5. KAYNAKLAR	45



ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
1.1. NCAM yapıları ve hücre zarı ile ilişkisi	3
1.2. NCAM polisializasyonu	4
3.1. NCAM izoformlarının western blot yöntemiyle analizi	35
3.2. NCAM-120 düzeyleri	36
3.3. NCAM-140 düzeyleri	37
3.4. NCAM-180 düzeyleri	38
3.5. Lipid peroksidasyonu (LPO) düzeyleri	40
3.6. Glutasyon (GSH) düzeyleri	40



TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa No
2.1. Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi	25
3.1. Kan glukoz düzeyleri	35
3.2. NCAM izoformlarının densitometrik analiz sonuçları	36
3.3. LPO ve GSH düzeyleri	39



KISALTMALAR LİSTESİ

μ l	Mikrolitre
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CAM	Hücre adezyon molekülleri
DNA	Deoksiribonükleik asit
GSH	Glutasyon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HDA	Hidroksialkenal
Ig	İmmunoglobulin
kb	Kilobaz
kDa	kiloDalton
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LPO	Lipit peroksidasyon
LTD	Uzun dönem depresyonu
LTP	Uzun dönem potansiyeli
M	Molar
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
ml	Mililitre
mRNA	Elçi ribonükleik asit
NCAM	Nöral hücre adezyon molekülleri
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
NO	Nitrik oksit
O ₂	Oksijen
OH	Hidroksil
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforez
PSA	Polisialik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
STZ	Streptozotosin

ÖZET

Doktora Tezi

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN DİYABETİK RATLARDA HİPOKAMPUS VE BEYİN KORTEKSİNDE N-CAM PROTEİN EKSPRESYONU VE BUNA MELATONİN VE VİTAMİN E'NİN ETKİSİ

Mehmet TUZCU
Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
2004, Sayfa: 62

Hiperglisemi diyabetik nöropatinin ilerlemesi ve gelişmesinde kritik bir rol oynar. Nöral dejenerasyona sebep olan hipergliseminin mekanizmalarından biri diyabetle birlikte yükselen oksidatif strestir. Nöral hücre adezyon molekülleri immünoglobulin süperaillesinin üyeleridir. Alternatif bağlantılarla meydana gelmiş NCAM 180, NCAM 140 ve NCAM 120 olarak ifade edilen üç temel NCAM formu vardır. NCAM'ın öğrenme ve hafıza oluşumu esnasında meydana gelen sinaptik değişikliklere aracılık ettiği öne sürülmüştür. Bu çalışma hipokampus ve kortekste nöral hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu değerlendirmek ve buna melatonin ve vitamin E'nin etkisini araştırmak için yapılmıştır. Diyabet karın içine streptozotocin (STZ) enjeksiyonu yolu ile oluşturulmuştur. NCAM ekspresyonu western blot metodu ile hipokampus ve kortekste tespit edilmiştir.

Diyabette oksidatif aktivitenin artışı, antioksidan savunmanın yetersizliği, protein glikozilasyonu, glukoz metabolizmasını olumsuz yönde etkilemektedir. Diyabette lipid peroksidasyonunun sonucu oluşan malondialdehit (MDA) miktarı artış göstermektedir. MDA proteinlerin, fosfolipitlerin ve nükleik asitlerin amino gruplarıyla reaksiyona girebilmektedir. Glutasyon (GSH) serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur. Ayrıca protein yapısındaki sülfhidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin inaktive olmasını engeller. Deneysel diyabet çalışmalarında GSH miktarında aşırı bir düşüş olduğu görülmüştür. Diyabetik hayvanlarla yapılan bu çalışmalarda GSH'ın düşüşüne karşılık olarak MDA miktarında artış olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada STZ ile oluşturulmuş diyabetik rat korteks ve hipokampus dokusunda NCAM ekspresyonu, MDA konsantrasyonu ve GSH düzeylerinde meydana gelen değişiklikler, bu değişiklikleri önlemede iki önemli antioksidanın (melatonin ve vitamin E) etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla kontrol, STZ ile oluşturulmuş diyabetik ratlar, antioksidan (melatonin ve vitamin E gibi) uygulanmış ratların hipokampus ve korteksinde MDA ve GSH miktarları ölçülmüştür. Gruplar arasındaki farklılıklar çift yönlü varyans analizi kullanılarak hesaplanmıştır. Post-Hoc hesaplaması için de Bonferroni'nin *t*-istatistik analizi kullanılmıştır. *p* değeri <0.05 olarak alınmış, *p* değerinden küçük olan bulgular anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar; STZ ile oluşturulmuş diyabetin, öğrenme ve hafızaya katılan beyin bölgelerinde N-CAM ekspresyonunda dengesizliğe sebep olduğu görülmüştür. Diğer taraftan melatonin ve vitamin E uygulanan diyabet gruplarında MDA seviyesinin diyabet grubuna göre düşük olduğu, GSH seviyesinin ise yine diyabet grubuna göre yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Diyabet, STZ, Serbest radikaller, NCAM, Hipokampus, Korteks, Lipid peroksidasyonu, Glutasyon, Melatonin, Vitamin E, Western Blot.

ABSTRACT
PhD Thesis

EFFECT OF MELATONIN AND VITAMIN E ON THE EXPRESSION OF NCAM PROTEINS IN
HIPPOCAMPUS AND CORTEX IN BRAIN OF EXPERIMENTALLY INDUCED DIABETIC RATS

Mehmet TUZCU
Firat University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
2004, Page: 62

Hyperglycemia plays a critical role in the development and progression of diabetic neuropathy. One of the mechanisms by which hyperglycemia causes neural degeneration is via the increased oxidative stress that accompanies diabetes. Neural cell adhesion molecules (NCAMs) are members of the immunoglobulin superfamily. There are three major NCAM forms referred to as NCAM 180, NCAM 140, and NCAM 120 which are generated by alternative splicing. It has been proposed that NCAMs mediate the synaptic changes that occur during learning and memory formation. The present study was designed to evaluate the expression of neural cell adhesion molecules (NCAM) and to examine effect of melatonin and vitamin E on this expression. Diabetes was induced in rats via intraperitoneal streptozotocin injection. NCAM expression was detected in the hippocampus, cortex by an western blotting method.

In diabetes, especially uncontrolled diabetes increase in the oxidative activity, insufficiency of antioxidant defence and protein glycosylation negatively effect the glucose metabolism. Malondialdehyde (MDA) which is the product of lipid peroxidation increases in diabetes. MDA can make reactions with amino groups of nucleic acids, proteins and phospholipids. Glutathione (GSH) prevents cells from oxidant damage by making reactions with free radicals and peroxides. Furthermore, it prevent most proteins from being inactive by holding sulphhydryl groups reduced, in proteins structure. In experimental diabetic studies, excessive decrease was found in GSH levels. In diabetes, MDA was found to be increased, meanwhile GSH decreased. In the present study, the changes in NCAM expression pattern, MDA concentrations and GSH levels were investigated in hippocampus and cortex of STZ-induced diabetic rats, the effects of two potent antioxidant (melatonin and vitamin E) were also studied. For this aim, MDA and GSH contents were measured in control, STZ-induced diabetic rats and antioxidant (such as melatonin and vitamin E) treated rats in hippocampus and cortex. Significance of differences between groups was evaluated by means of two-way analysis of variance in conjunction with Bonferroni's *t*-statistics, and *p*-values <0.05 were considered statistically significant.

The results suggest that streptozotocin- induced diabetes causes an imbalance in expression of NCAM in those brain regions involved in learning and memory. In addition, it was found that the MDA level decreased and GSH level increased in diabetic groups supplied with melatonin and vitamin E when compared to diabetic groups.

Key words: Diabet, STZ, Free radicals, NCAM, Hippocampus, Cortex, Lipid peroxidation, Glutathione, Melatonin, Vitamin E, Western blotting.

1. GİRİŞ

1.1. HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLLERİ

Hücre adezyon molekülleri, birçok hücrenin yüzeyinden salınan glikoprotein moleküllerinden oluşan yapılardır. Bunlar hücrelerin birbirlerine, endotel hücrelerine veya ekstrasellüler matrikse bağlanmalarını sağlayan yüzey proteinleridir. Geniş çapta yapılan birçok çalışmada adezyon moleküllerinin homofilik ve heterofilik mekanizmalar ile hücre-hücre ve hücre-substrat gibi farklı bağlantılar oluşturduğu gözlenmiştir [1]. Adezyon moleküllerinin reseptörlerine ve ligandlarına bağlanmaları ile oluşan cevap ve etkileşim sayesinde rol oynadıkları bazı fonksiyonları şöyle sıralayabiliriz;

- Doku/organ gelişimi ve hücre çoğalması,
- Embriyogenez,
- İmmün ve enflamatuvar hücrelerin enflamasyon bölgesine göçü,
- İmmün yanıtın başlatılması ve yayılması,
- Ekstrasellüler matriksten hücreye bilgi akışı,
- Yara iyileşmesi,
- Kanser metastazı.

Moleküler biyoloji çalışmalarında transmembran düzeyinde birçok hücre adezyon molekülü bulunmuştur. Bunlar integrin, kadherin, selektin ve immünoglobülin süper ailesidir [2].

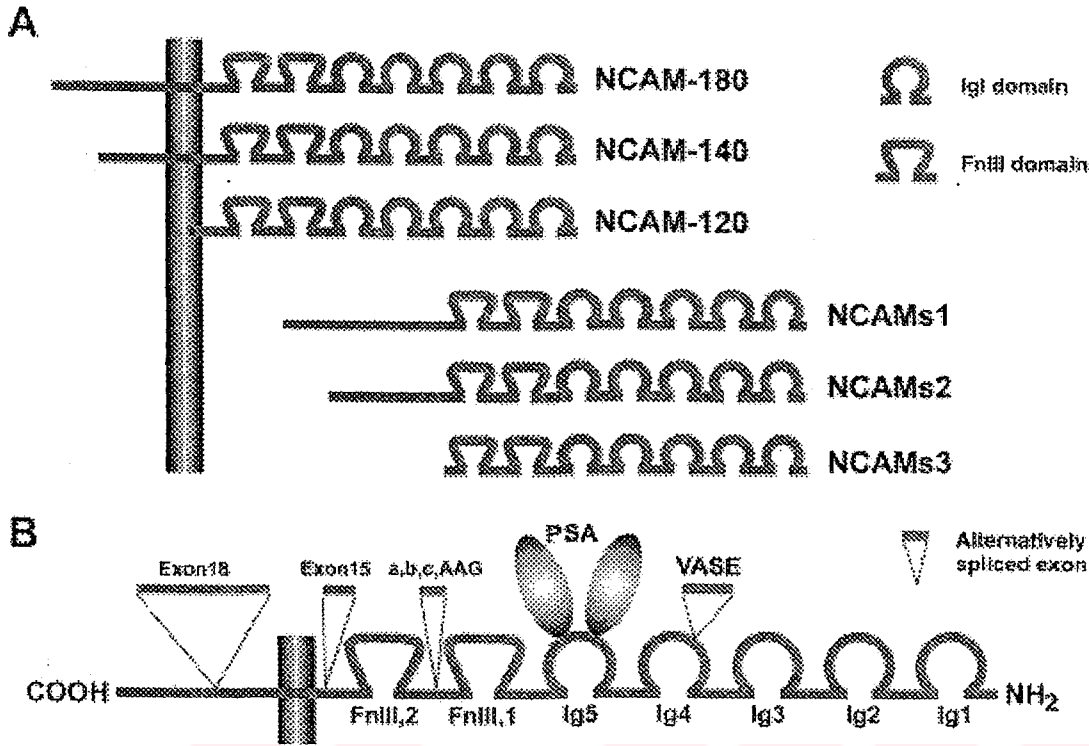
İntegrinler hücrel matriks proteinleriyle etkileşim halinde olan bir protein ailesidir. İntegrin fonksiyonunun bozulması ergin ratlarda hipokampusun CA1 bölgesindeki LTP'nin bozulmasına sebep olur [3]. İntegrinler ayrıca motor sinir terminallerinde serbest kalan nörotransmitterin artmasını uyaran güç demek olan kısa dönem sinaptik plastisitesine katkıda bulunur [4]. Son çalışmalarda tirozin kinaz sinyallerini etkilediği bulunan integrin-associated proteinin (IAP) ratlarda hafıza performansını etkilediği çok açık bir şekilde görülmüştür [5,6].

Kadherinler hücre tanınmasında ve gelişme esnasındaki bağlantılarda önemli bir rol oynadığı bilinen protein ailesidir. Kadherinler erginlerde hipokampus ve ön beyinde eksprese edilirler ve sinaptik kısımlarda lokalize olurlar [7,8,9,10]. Kadherinlerin sinaptik lokalizasyonda yer almadaki ısrarı sinaptik plastisitede potansiyel bir rolünün olduğunu göstermektedir [11]. Kadherin fonksiyonunun engellenmesi temel sinaptik özelliklere etki etmeksizin sadece LTP'yi etkilediği için kadherinlerin sinaptik plastisitede sadece yapısal görevi olmasından ziyade bir sinyal rolü bulunduğu düşüncesini olası kılar. Kadherinlerle etkileşim halinde olan sitoplazmik protein ailesinden olan kateninler, kadherinler tarafından başlatılan sinyal olaylarının aracılardır. Kateninler genç ve ergin nöronların sinapslarında bulunmaktadır [11,12].

Aktive immünoglobülinler (Ig) yaklaşık olarak 100 aminoasit içeren iki beta tabakasından oluşmuştur. Ig homolog ünitesi sabit (C1-set, C2-set), değişken (V-set) ile intermediate (I-set) kısımlarını içerir [2,13] (Şekil 1.1.1). Bu yapı anti paralel β - zincirleri ve sayısı farklı olan, sistein etrafında aminoasit dizilerini içerir. Bunlar hücre içindeki iskelet sistemine bağlanan tek geçişli transmembran glikoproteinlerdir. Bazı çalışmalarda Ig familyasının hem sinaptogenez hem de sinaptik plastisiteye katıldığı bildirilmiştir [14,15]. Ig süperailisi üyeleri tarafından aracılık edilen hücre-hücre bağlantıları sadece nöronlar arasında değil aynı zamanda nöronlarla glialar arasında da bulunabilir. Nöronlarla glialar arasındaki bağlantılar sinaptik düzenlemelere de ayrıca katılabilirler [16,17].

Hücre adezyon molekülleri (CAM) hücre dışı matriks komponentlerinin yanısıra hücrelerle diğer hücrelerin arasındaki bağlantılara aracılık ederler ve böylelikle sinaptik plastisitedeki değişiklikleri etkilerler. Bunların yanısıra, hücre adezyon moleküllerinin nöron gelişmesinin dahil olduğu ilk etaptaki hücresel cevaplarda hücreler arası sinyal transdüksiyon akımını aktive ettiği gözlemlenmiştir [18]. Bunlara ek olarak belirli CAM'ların ekspresyonları nöronal aktiviteyle etkilenebilir [19]. CAM'lar hücre içi ve dışı sinyallere aracılık ederler. CAM'ın gelişme esnasında nöronal bağlantıların formasyonu için önemli olduğu ve son zamanlarda yapılan çalışmalarla nöronal CAM'ın sinaptik plastisiteye katıldığı öne sürülmüştür [20,21,22].

Nöral hücre adezyon molekülleri (NCAM) iyi bilinen hücre adezyon moleküllerinden biridir [23]. NCAM da immünoglobulin süper ailesi içinde incelenen protein yapılardır. NCAM molekülü N terminaline özgü 5 adet C2 bölgesi içerir. NCAM yapılarının extrasellüler kısmına tutunmuş uçlarında 5 adet Ig bölgesi (Ig-I) ve 2 adet fibronektin homolog bölgesi (Fn-III) içermektedir (Şekil 1.1.1) [13]. 5 Ig bölgesi de polisialik asit (PSA) içeren bölgelere sahiptir, bu bölgeler hafıza ve öğrenmede önemli roller üstlenir. NCAM salınımı sadece sinir sisteminde değil, ayrıca beyin omurilik sıvısı (BOS), amniyon sıvısı, plazma, kalp kası ve çizgili kas gibi yapılarda da bulunur. NCAM ekspresyonunun kalbin innervasyonu ve morfogenezinin dahil olduğu çoğu morfogenetik olayda da önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir [24,25,26]. NCAM'ın yüksek seviyeleri mizaç bozukluğu, şizofrenli hastaların beyin-omurilik sıvısında kimyasal beyin tahribi durumunda gözlemlenmiştir [27,28]. Bu yüzden NCAM'ın beyin patolojisi ve plastisitesinde önemli bir rol oynadığı düşünülür [29]. Bu moleküller ayrıca hücresel göç, aksonal gelişme, sinaptik plastisite ve çevresel aksonların rejenerasyonuna katılırlar [30,31,32,33]. NCAM sadece merkezi sinir sisteminde yapısal organizasyona katılmaz aynı zamanda ergin beyinde sinaptik modifikasyonlara da katılır. Bunlara ek olarak periferel sinirlerin çıkarılmasından sonra NCAM ekspresyonunun yükseldiği gözlemlenmiş ve bu da NCAM'ın rejenerasyona katkıda bulunabildiği düşüncesine bizleri yönlendirmiştir [34,35,36].



Şekil 1.1.1.: (A) Üç major NCAM izotipinin genel yapıları; hücre zarı ile ilişkisi. (B) NCAM izotiplerinin alternatif birleşmeler ile farklı adezyon molekülleri ve PSA ile olan bağlantısı [13].

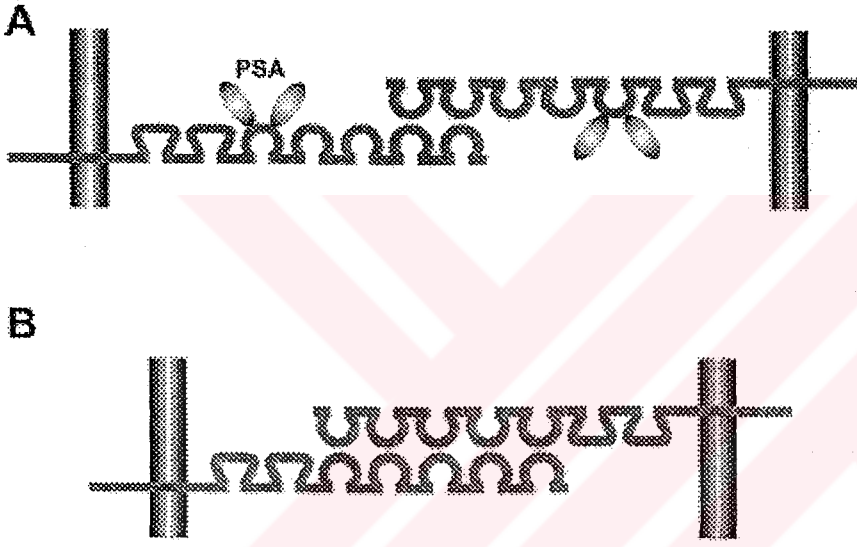
1.1.1. Nöral Hücre Adezyon Moleküllerinin Yapısı ve Özellikleri

NCAM nöronal plastisitede sinaps oluşumuna katılan moleküllerin başında gelir. NCAM'ın hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri ile nöron gelişmesini arttırmada düzenleyici olarak hareket eden yüzey glikoproteinleri olduğu bilinmektedir. [37,38,39,40]. Farklı bağlantılarla oluşmuş beyinde molekül ağırlıkları 120, 140, 180 kDa olan 3 major NCAM izoformu bulunmuştur [13,41]. Bunlardan NCAM-180 ve NCAM-140 formları hücre dışından hücre içine doğru COOH zincirleri ile uzanmış transmembran proteinleri iken, NCAM-120 sadece hücre membranına kadar uzanır. NCAM-120 molekülü ise glikosilfosfatidil inositol (GPI) vasıtasıyla membrana tutunurlar ve sitoplazmada ilerlerler (Şekil 1.1.1). Aynı şekilde tüm NCAM yapılarının ekstrasellüler kısmına tutunmuş uçlarında 5 adet Ig bölgesi (Ig-I) ve 2 adet fibronektin homolog bölgesi (Fn-III) içermektedir (Şekil 1.1.1) [13].

Bu protein yapılar güçlü bir şekilde sinir sisteminden bolca üretilirler [42]. Aşırı NCAM ekspresyonu fonksiyonel değişiklik olmaksızın nöromusküler sinapsların yapı ve büyüklüğünde artışa neden olur [43]. NCAM hücre membranına bağlandıktan sonra transmembran sinyalinin ortaya çıkarır. Böylece NCAM'lar adezyonu diğer hücrelerle aracı olarak ve ekstrasellüler matrikste veya aktive intrasellüler sinyal yollarında görev alarak yaparlar [13,42]. Kısaca hücresel cevaplarda hücreler arası sinyal transdüksiyon akımını aktive ederler.

Alternatif bağlantılarla plazma membranına moleküller farklı şekillerde tutunurlar [1]. Alternatif uç uca bağlanma ile NCAM yapılarının değişik bölgelerine tutunan birkaç protein yapısı daha vardır. Bunlar Exon 15, Exon 18, a, b, c, AAG ve Ig bölgesine tutunan VASE ve PSA'dır [13]. Özellikle olarak dördüncü Ig bölgesi 7.ve 8. eksonlar tarafından kodlanır, bu eksonların arasına da VASE denilen 30 bazlık ekson girebilir (Şekil 1.1.1).

Ekstrasellüler kısmıyla NCAM hem homofilik hem de heterofilik cis ve trans etkileşimlerine aracılık eder. Bu yapının NCAM tarafından transsellüler homofilik tanımaya aracılık edebilen antiparalel dimerlerden şekillenen bir aksi form olabileceğini ifade etmektedir. Fakat molekül ekstrasellüler matriks sayısına ve heterofilik etkileşimler arasındaki diğer hücre adezyon moleküllerine bağlı olabilir.



Şekil 1.1.2.: Homofilik NCAM moleküllerinin polisializasyonu. (A) Homofilik bağlanma ile PSA-NCAM kompleksinin oluşması, iki Ig domaini birleşir. (B) PSA yokluğunda NCAM yapısındaki beş Ig domainin resiprokal olarak birleşmesi [13].

Sonuç olarak NCAM homofilik ve heterofilik interaksiyonlar ile hücre adezyonunu idare eder [13]. Homofilik aktivasyon Ca^{+2} dan bağımsız bir mekanizma ile olurken, NCAM veya NCAM antikorlarının belli nöral hücrelerde intrasellüler Ca^{+2} artışına neden olduğu gösterilmiştir [13,44]. Bu bağlanmada iki NCAM molekülünün Ig5 modülü ve Ig3 modülü arasında resiprokal bir etkileşim olduğu düşünülmektedir (Şekil 1.1.2) [13].

NCAM ekspresyonu bazı önemli özel dokularda değişik şekillerde kendini gösterir. Tüm NCAM izoformları insanda 11., ratlarda 8. ve farede 9. kromozomda bulunan tek bir gen ile kodlanmaktadır. Fakat alternatif bağlantılar ve translasyon sonrası modifikasyonlarla farklı izoformları üretilebilir [45]. NCAM geni en az 25 ekson içerir [46,47,48,49]. 7.4, 6.7, 5.2, 4.3 ve 2.9 kb'lık beş NCAM-mRNA sınıfı, poliadenilizasyonu ve alternatif bağlantısıyla kemirgen hayvanlarda meydana gelmiştir. 1-14'e kadar tanımlanan 14 ekson bütün NCAM-

mRNA'larında yaygın olarak görülmüştür. 15-19 eksonlarını gösteren 3 uç eksonunun kullanılmasıyla farklı COOH uçlarına sahip yukarıda sayılan üç büyük NCAM polipeptidini kodlayan mRNA'lar üretilir [50,51,52]. 7.4 kb'lık mRNA sınıfında ekson 14, 19, 18, 17, 16 eksonları tarafından takip edilir ve bu mRNA sınıfı uzun sitoplazmik bölgeye sahip transmembran NCAM-180'i gösteren NCAM türlerini kodlar. 6.7 kb'lık mRNA sınıfı 1-14 eksonlarına ek olarak 16, 17, 19 eksonlarını içerir, fakat ekson 18'i içermez [53].

Bu mRNA sınıfı NCAM-180'den daha küçük bir sitoplazmik bölgeye sahip NCAM-140'ı gösteren bir transmembran NCAM türünü kodlar. 5.2 ve 2.9 kb'lık mRNA sınıflarının her ikisinde 1-15 eksonlarını içerir, ancak 16-19 eksonlarından yoksundur. Bu iki sınıf mRNA alternatif poliadenilizasyonu yüzünden büyüklükleri farklıdır. Her iki sınıfta glikozilfosfatidil inositol (GPI) yoluyla membranı birleştiren NCAM-120'yi kodlar [53].

Sonuç olarak bu karmaşık yapılanmalar ve alternatif ekson kullanımı ile, transkriptin sonunda bilinen 3 major NCAM formu beyinde oluşur [54].

1.1.2. Öğrenme ve Hafızanın Şekillenmesinde Nöral Hücre Adezyon Moleküllerinin Rolü

Yapılan son çalışmalarda hipokampal mossy fiber sisteminde NCAM ve PSA salınımının farelerde ayrıntılı analizinde, NCAM salınımı sadece nöronal regülasyon için önemli değil; ayrıca göç (migrasyon) gibi yapısal değişiklikler, aksonal büyüme ve fasikülasyon ile plastisite aktivitesi içinde gerekli olduğu gösterilmiştir [1].

Öğrenme üzerine NCAM'ın katılımının daha fazla kanıtı NCAM antikorlarının intraventriküler enjeksiyonu ile ratlarda, enjeksiyondan 6-8 saat sonra öğrenme ve uzun dönem hafızaya zarar verdiği, 48 saat sonra yapılan pasif sakınma cevabı testi ile gösterilmiştir [55]. Aynı deneysel çalışma tavuklarda da yapılmış ve hafıza kaybına (amnezi) neden olmuştur [56]. Aynı şekilde NCAM'dan yoksun bırakılan farelerde uzaysal öğrenme ve bulma yeteneğinin bozulduğu, Morris water maze testlerinde öğrenmelerinde geri kalmalar olduğu tespit edilmiştir [1,57]. Bununla beraber öğrenmedeki bu yetersizliğin neden kaynaklandığı bilinmemektedir. NCAM'ın posttranslasyonel modifikasyonunda öğrenme ile ilgili değişiklikler gözlemlenmiştir.

NCAM sadece gelişme esnasında merkezi sinir sisteminin yapısal organizasyonuna katkıda bulunmaz, aynı zamanda beyindeki tahrip olmuş sinaptik modifikasyonlara da yardımcı olur. Bu nedenle NCAM salınımının, özellikle PSA-NCAM'ın öğrenmenin ve uzun dönem hafızanın oluşumunda ne kadar gerekli olduğu anlaşılmaktadır [58].

1.1.3. Sinir Sistemi Hastalıkları ile Nöral Hücre Adezyon Moleküllerinin İlişkisi

Beynin yaşlanması, Alzheimer hastalığı ve serebrovasküler yaralanmalarda karşımıza çıkan bazı ortak bozukluklar vardır. Bunlar kalsiyum düzenlenmesindeki eksiklikler, mitokondri işlevlerindeki azalmalar, reaktif oksijen ürünlerinin ortaya çıkışındaki artışlar, bu ürünlerin dokularda birikimi ve immün sistem fonksiyon bozukluğudur. Etki-sonuç ilişkilerinin açıklığa kavuşturulması için nöron hücre kültürü sistemi kullanılmaktadır. Kullanılan kültür sistemlerindeki hücrelerin yaşlarına göre bu etki-sonuç ilişkilerini ortaya çıkarmak mümkündür. Kültür modellerinde nöronların kalıtsal özellikleri ve yaşla birlikte oluşan beta-amiloid birikimi ve apoptozis gelişimi takip edilebilmektedir. Mevcut sorunun çözülmesi için günümüzde üzerinde çalışılan noktalar kalsiyum artışının inhibisyonu, reaktif oksijen ürünlerinin etkilerinin azaltılması ve mitokondrial fonksiyonun düzeltilmesi ile enerji üretiminin sağlanmasına yöneliktir. Genç ve yaşlı nöronların rejenerasyon ve çoğalma yeteneklerinin ortaya çıkarılması yaşa bağlı gerilemelerin düzeltilmesinde ve nöron hasarı ile seyreden hastalıkların tedavisinde umut vadetmektedir. İşte bu noktada NCAM moleküllerinin olumlu etkileri gündeme gelmektedir [59].

Mizaç bozukluğu ve şizofrenlerde BOS kimyasında beyin parankiminin tahribine bağlı yüksek NCAM düzeyleri tespit edilmiştir. Tavuklarda ve ratlarda NCAM antikollarının intraventriküler enjeksiyonu ile öğrenme sürecinin bozulduğu görülmüştür [55]. Bunun yanısıra PSA-NCAM'ın enzimatik olarak ortadan kaldırılmasıyla ratlarda uzaysal öğrenme engellenmiştir [60]. Yine deneysel olarak deniz yumuşakcıklarından *Aplysia californica*'lar üzerinde yapılan çalışmalarda *Aplysia* hücre adhezyon moleküllerinin (apCAM) düzeylerinin düşürülmesi ile yeni sinaptik bağlantıların öğrenmeyle ilişkili formasyonu olumsuz etkilediği gösterilmiştir [61].

1.1.4. Sinaptik Plastisite

Sinir sisteminin gelişmesi nöronal döngüyü oluşturmak için yol gösteren sinaptik bağların yeniden oluşmasının devam ettirilmesiyle karakterize edilir. Erginlerde sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza oluşumu gibi fizyolojik ve patolojik şartların tanımlanması ve nöronal döngünün tamamlanmasıyla anlaşılır [62]. Nöral hücre adezyon molekülleri ve onun polisiale olmuş formunun (PSA-NCAM) nöronal plastisite ve sinapslarda çok önemli bir rol oynadığı bilinir [63].

Nöronal plastisite beyin fonksiyonlarından öğrenme ve hafıza formasyonunda önemli görevler alır [54]. Kortikal nöronların farklılaşması ve iyileşme için, sinaptik plastisitenin aktivite artışı için PSA-NCAM'ın güçlü bir şekilde salınımı oldukça önemlidir. Kortikal

haritaların yeniden organizasyonunun temelini oluşturan mekanizmaları fonksiyonel iyileşmeler ile birleştirirler. Burada NCAM ve PSA-NCAM gibi birçok molekül rol oynar. Bunlar nöronal ağ plastisitesinde ilişki kurmaya yararlar, böylece kortikal yeniden organizasyona katkıda bulunurlar [44].

Çözünebilen NCAM tipleri beyinde, beyin omurilik sıvısında ve plazmada bulunur [13,64]. NCAM hücre migrasyonunu, nörit uzanımını ve fasikülasyonunu etkileyerek beyinde sinapsların oluşumunda olası rol oynarlar. Ayrıca NCAM'ın etkisinin bloke edildiği farelerde olfaktor bulbusun ve hipokampustaki mossy fiber sistemin gelişiminin geri kaldığı gösterilmiştir [13]. Bu nedenle NCAM molekülleri beyin gelişmesi esnasında Merkezi Sinir Sistemi (MSS)'nin yapısal organizasyonuna girerken, olgun beyinde ise sinapsların yeniden oluşum ve düzenlenmesine katılmaktadırlar. Bu moleküllerin sinaptik plastisite dışında hücre göçü, aksonal büyüme, periferik aksonların yenilenmesinde de görev aldıkları düşünülmektedir [1].

1.1.5. Sinaptik Plastisite ve PSA-NCAM

NCAM formları içinde sinaptik plastisitede rol alan en önemli molekül PSA-NCAM'dır [13,65]. PSA, alfa-2-8-linked sialik asit artıklarının uzun homopolimerazıdır [1]. NCAM izoformlarının %30'unu PSA oluşturmaktadır. Bu nedenle PSA-NCAM terimi sıklıkla kullanılmaktadır. PSA'nın buradaki rolü karşılıklı membranlar arasındaki adezyonların kolaylıkla yapılmasını sağlamaktır. Polisialize olmuş yapı NCAM'ın adhezif etkilerini artırır [1,66].

Sinaptik plastisite ve nöronal aktiviteye bağlı nöroenezis olayında önemli rol alan PSA-NCAM'ın, özellikle beyinin belli bölgelerinde düzeylerinin artmış olduğu gözlenmiştir. Bu bölgeler hipokampal formasyonda rol alan olfaktor sistem ve dentat gyrustur [67,68,69,70]. Yaşa bağlı olarak ortaya çıkan hafıza bozuklukları hipokampal plastisitedeki azalma ile birliktedir. MSS'nin oluşumunda NCAM'ın polisialize olmamış hali rol alırken, gelişimi sırasında PSA-NCAM bolca sentezlenir. Kemirgenlerde hipokampal formasyonda, yeni oluşan nöronların farklılaşma ve matürasyonunda da PSA-NCAM salınımının aktif rol aldığı gösterilmiştir [37,69]. Dişli granül hücrelerinin polisilizasyonu ise yaşla birlikte azalır. Ancak yaşla bağlantılı aktif azalmanın polisilizasyondaki azalmayla direkt bir ilişkisi bulunmamaktadır [71,72].

Kafa travması sonrası fonksiyonel iyileşme ve tamirde, nöronal bağlantıların yapı ve fonksiyonel plastisitesinde de PSA-NCAM görev alır [44]. PSA-NCAM'ın güçlü bir şekilde salınımı beyin yapılarında göze çarpan doku reorganizasyonunda ve plastisitede önemli roller üstlenir. NCAM polisilizasyonunun artışı yetişkin ratlarda, hem pasif kaçınma cevabının

öğrenilmesinden sonra ve hem de Morris'in su tankı testinde (Morris water maze) uzaysal öğrenmeden sonra gösterilmiştir [73,74].

Bu artış ratların dentat gyrusunun granül hücrelerinde tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada polisializasyondaki bu yükselme hipokampal oluşumda dişli granül hücrelerinin bulunduğu yerde ve öğrenmeye katılan kortikohipokampaldan şekillenebilen entorhinal korteksteki nöronlarda lokalize olmuşlardır [1,75]. NCAM polisializasyonunun artışı aynı şekilde öğrenmeye katılan kortikohipokampal yolda PSA-NCAM salınımında aktive etmektedir [73]. Ancak bu formasyon için hipotalamo-pitüiter-adrenal aksın önemli olduğu ortaya konulmuştur [1]. Polisializasyonun artışı uygulamadan sonra yukarıda belirtilen her iki öğrenme testi içinde sadece 10-12 saat gözlemlenmiştir. Bunun nedeni de muhtemelen nörogenezin artmasından önce, oluşan öncül nöronlardan kaynaklanmaktadır [73].

Hipokampal formasyonun beyindeki esas hedefi glikokortikoid salınımıdır. Bu hormonlar periferik yolla adrenal bezlerden salınırlar ve tüm vücutta ciddi etkileri vardır [76]. Ratlarda major salınan glikokortikoid, kortikosteron olup stres ve fizyolojik cevapları kolaylaştırmada düzeyleri artar. Kognitif fonksiyonlar ve LTP (long term potentiation) cevabında bir U şekli vardır, hipotalamo-pitüiter-adrenal aks aktivitesinin düzensizliğinde kognitif yetersizlikler ve LTP'de değişiklikler olur [77]. Bu etkiler kortikosteronun hipokampal formasyondaki yapısal plastisitede olan major etkileridir [76]. Örneğin kortikosteronun baskılanması veya adrenalectomi sonrasında dentat gyrusta nörogenezin arttığı görülmüşken, tersine eksojen yöntemler ve stresle oluşturulan yüksek hormon seviyesi aynı yapılarda nörogenezi azaltmaktadır [78].

Genellikle uzun dönem hafızanın oluşmasındaki yapısal değişikliklerin nöronal bağlantılarla oluştuğuna inanılmaktadır. Uzun dönem hafızanın oluşmasında ve öğrenmede NCAM'ın rolü ile ilgili son zamanlarda ciddi çalışmalar yapılmaya başlanmıştır [58]. Öğrenme ve hafızanın oluşumunda temel mekanizma olan sinaptik plastisiteye NCAM moleküllerinin aracılık ettikleri artık bilinmektedir [58,79]. Öğrenme sürecinde nöronal bağlantılarda yapısal değişikliklerin oluşması uzun dönem hafızanın yerleşmesini sağlar. Bu nöronal bağlantı ve yeniden organizasyon işleminde NCAM molekülleri çok önemli görevler üstlenir [80].

NCAM salınımının, özellikle PSA-NCAM'ın öğrenmenin ve uzun dönem hafızanın oluşumunda ne kadar gerekli olduğu anlaşılmaktadır [58]. Kısaca olayı şöyle izah edebiliriz; PSA-NCAM'ın artışı ile adhezyon hücrelerinde azalmaya ve nörit uyarılmasında artışa neden olmaktadır. Nörogenezin indüklenmesi ile hipokampal formasyon artmakta, öğrenme ve hafıza işlemleri de olumlu etkilenmektedir. Sonuçta polisialize olmuş NCAM, uzun dönem hafızanın (depo hafızanın) kurulması esnasında nöronal bağlantıların yapısal modellerinin yeniden

oluşumuna katkıda bulunmuş olurlar [81]. En önemlisi PSA-NCAM salınımı hızlı bir şekilde, Ca^{+2} bağımlı nöronal aktiviteyi şekillendirebilmektedir [44,82,83].

1.1.6. Sinaptik Plastisite ve LTP

LTP (Long Term Potentiation) ve LTD (Long Term Depression) gibi mekanizmalar kortikal reorganizasyon haritalarının temelini oluşturduğu kabul edilmektedir. Bunların beyinde bilgi depolamanın hücresele temelini oluşturduğuna inanılmaktadır [44]. PSA-NCAM'ın presinaptik plastisiteye spesifik katkıları olduğu bilinmektedir, bu olay LTP olarak adlandırılır [1].

Yetişkinlerde öğrenme ve hafızaya alma olaylarında rol oynayan nöronal plastisitenin NCAM molekülleri tarafından sağlandığı artık bilinmektedir [80,84]. Sinaptik plastisitenin bir ifadesi olan hafızanın oluşumunda NCAM'ın rolünü anlamak için hipokampusta mossy fiber sinapsta LTP uyarısı kullanılır [1]. LTP *in vivo* ve *in vitro* şartlarda hipokampal sinir liflerinin yüksek sıklıktaki uyarıları ile uyarılabilen sinaptik geçişlerdeki uzun süren bir yükselmedir. LTP öğrenme ile çoğu özellikleri paylaşır. Hafıza ve öğrenmede sinaptik değişiklikleri kontrol ettiği sanılan moleküler mekanizmaları anlamada ve tespit etmede artık yaygın olarak LTP ölçümü kullanılmaktadır. Sinaptik plastisite ve LTP formasyonu hipokampal dilimde bulunan datalar ile hazırlanır [85].

Bir uygulamada *in vitro* şartlarda lokal NCAM antikorlarının ratların hipokampal kesitlerindeki CA1 bölgelerine enjeksiyonu ile LTP'nin devamlılığını ve uyarısını engellediği gösterilmiştir [85].

Sinir sisteminin gelişimi sırasında oluşan sinaptik değişiklikler, sinaptik plastisitenin de kapasitesinde değişikliklere neden olur. Tanımlanan bu kapasite hatırlama ve öğrenme yeteneğinde önemli rol oynar. Erginlerde bu olay öğrenme ve hafıza oluşumu gibi fizyolojik ve patolojik şartların tanımlanması ve nöronal döngünün tamamlanması ile anlaşılır [61].

1.2. HİPOKAMPUS

Hipokampus, serebral korteksin değişik bir tipinden oluşan uzunca bir yapıdır. Gerçekte, temporal lob korteksin bir bölümünün, yan ventrikülünün ventral yüzünü oluşturmak üzere içeriye doğru katlanmasından ibarettir. Hipokampusun bir ucu amigdaloid nükleuslara dayanır, kenarlarından biriyle de temporal lobun ventromedial korteksi olan parahipokampal girusla kaynaşır.

Hipokampusun, serebral korteks bölümlerinin çoğu ile olduğu kadar, limbik sistemin temel yapıları olan amigdaloid, hipotalamus, septum ve korpus mamillare ile de sayısız bağlantısı vardır. Hemen her tip duyuşsal algı, anında hipokampusun çeşitli bölümlerinin aktivasyonuna

neden olur ve hipokampus bir çok çıkış sinyallerini, hipotalamus ve limbik sistemin öteki bölümlerine dağıtır, özellikle en büyük çıkış yollarından biri fornikse gider. Böylece hipokampus da, amigdaller gibi duysal giriş sinyallerinin uygun limbik reaksiyonları doğuracak ek bir kanaldır.

Hipokampusun bir başka özelliği de, çok zayıf elektriksel uyaranların, stimülasyonu kesildikten sonra saniyelerce devam eden lokal epileptik nöbetler meydana getirmesidir. Bu durum, hipokampusun normal fonksiyon durumlarında bile uzun süren sinyaller verebileceğini düşündürmektedir [86]. Hipokampal epilepsi sırasında kişi çeşitli psikosomatik etkiler algılamaktadır. Bunlar arasında; koklama, görme, işitme, dokunma ve başka tipte halüsinasyonlar bulunur. Kişi bilincini kaybetme ve bu halüsinasyonların gerçek dışı olduğunu bilse bile, bunları bastıramaz, kontrol edemez. Hipokampusun bu aşırı duyarlılığının nedenlerinden biri belki de, beynin başka bölgelerindeki korteksten farklı olarak altı tabaka yerine ancak üç normal tabakası olan bir korteks tipinde olmasıdır.

Hipokampus, epilepsinin tedavisi amacıyla birkaç vakada cerrahi olarak çıkarılmıştır. Bu şahıslar daha önce öğrenmiş oldukları aktivitelerin çoğunu yeterli bir şekilde yapabilirler. Bununla beraber hemen hemen yeniden hiçbir şey öğrenemezler. Gerçekten kendileriyle her gün birlikte olan kişilerin bile isimlerini veya yüzlerini öğrenemezler. Ancak bir an için ya da aktiviteleri sırasında ne olduğunu anımsayabilirler. Böylece , yalnız kısa süreli primer bellekleri vardır. Bunlarda uzun süreli sekonder bellek oluşturma yetenekleri tamamen ya da büyük ölçüde ortadan kalkmıştır. Bu durum anterograd amnezi olarak bu isimlendirilmiştir. Hipokampusun bozulması, daha önce kazanılmış bellekte de bazı eksikliklere yol açar, yakın zamanlara ait bellek, uzak geçmişe göre biraz daha kuvvetlidir.

Hipokampus olfaktor korteksin bir parçası olarak gelişmiştir. En aşağı sınıf hayvanlarda, hangi besinlerin yenileceği, belirli objelerin kokusundan tehlikeli olabilecekleri, kokunun seksüel bakımdan davet edici olup olmadığını belirlemede ve hayati önem taşıyan öteki birçok kararların alınmasında önemli rol oynar. Böylece, beynin en erken gelişiminde, hipokampus kritik karar verici nöronal mekanizmayı oluşturarak, giriş sinyallerinin önemli tiplerini ve önem derecelerini belirleme fonksiyonunu yürütür. Belki de beyinin öteki bölümleri geliştikçe, öteki duysal alanlardan hipokampusa gelen bağlantılar bu karar verme yeteneği ile ilgili rolü devam ettirmektedir.

Hipokampusun, kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe çevrilmesine neden olan dürtüyü sağladığı ileri sürülmüştür. Yani bazı tip sinyalleri kalıcı deponun yer aldığı uzun süreli belleğin depo alanlarına taşır. Mekanizma ne olursa olsun, hipokampus olmadan, uzun süreli belleğin pekiştirilmesi mümkün olmamaktadır [87].

Öğrenme ve hafıza, limbik sistemde dahil olmak üzere, merkezi sinir sisteminin birçok bölgeleri ile ilgili kompleks fonksiyonlardır. Yeni edinilen bilgilerin depolanmasında hipokampusun önemli rolü olduğu bilinmektedir. Hipokampus'u etkileyen lezyonu olan hastalarda kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülmediği gözlenmiştir. Lezyonun sol hipokampusta olduğu durumlarda daha çok sözel hafıza etkilenirken, sağda olduğu durumlarda ise görsel hafıza etkilenmektedir [88].

Her türlü duyuşsal algı, anında hippocampusun çeşitli bölümlerini aktive eder. Korteks ile alt sinirsel oluşumlar arasında algılama, limbik sistem, soyut düşünme ve algılama, öğrenme, hafıza (data depolama), uzaysal hafıza gibi verilerin aktarılmasında hem köprü hemde kavşak rolü oynar [89].

1.3. KORTEKS

Beyin kabuğunun fonksiyonel bölümü başlıca iki-beş milimetre kalınlığında olan ince bir nöron tabakasından ibarettir. Total olarak metrekarenin dörtte biri kadar olan bu tabaka, beynin bütün kıvrımlarını örter ve yaklaşık 50-100 milyar nöronu içerir. Serebral kortekste yer alan hücrelerin çoğu üç tiptir. Bunlar granüler, fusiform ve karakteristik piramidal şekilleri nedeniyle piramidal adı verilen hücrelerdir. Özellikle, korteksin komşu alanları arasında uzanan çok sayıdaki horizontal liflere ve korteksten beynin ve medulla spinalisin alt bölgelerine ya da serebral korteksin uzak bölgelerine asosiyasyon lif demetlerinin içinde giden düşey lifler oldukça önemlidir.

Nörohistologlar serebral korteksi, hafifçe değişik mimari karakteristiklerine sahip; yaklaşık 100 farklı bölgeye ayırmıştır. Ancak bütün bu farklı bölgelerin hepsi, hipokampus bölgesi dışında korteksin altı ana tabakasına sahiptir. Spesifik duysal liflerin çoğu korteksin 4. tabakasında sonlanır. Korteksten çıkan liflerin çoğu 5. ve 6. tabakadaki nöronlardan başlarlar. Beyin sapı ve omuriliğe giden lifler genelde 5. tabakadan doğarlar. Talamusa giden çok büyük sayıdaki lifler 6. tabakadan çıkar. 1., 2. ve 3. tabakalardaki lifler, korteks içi bağlantı görevi yaparlar. Bunlardan özellikle 2. ve 3. tabakadaki çok sayıda nöron komşu kortikal alanlar arasında kısa yatay bağlantıları sağlarlar [90].

Çok sayıda piramidal hücreleri içeren agranüler korteks beyin korteksinin motor alanları için, hemen hiç piramidal hücre içermeyen granüler kortekste primer duysal ve motor alanları arasındaki asosiyasyon alanları için karakteristiktir. Piramidal hücrelerden başlayan uzun aksonlar, motor sinyalleri bazal gangliyonlara, beyin sapına, serebelluma ve medulla spinalise iletirler. Granül hücrelerinin kısa aksonları, korteksin kendi nöronal ağı içinde çeşitli sinyalleri nörondan nörona iletirler.

Serebral korteksin bütün alanları talamusla direkt afferent ve efferent bağlantılara sahiptir. Korteks, talamusla çok sıkı işbirliği gösterir ve hem anatomik hem de fonksiyonel olarak talamusun büyük uzantısı şeklinde kabul edilebilir. Ayrıca duyu organlarından kortekse gelen yolların hepsi, olfaktor traktus dışında, talamustan geçerler [91].

1.4. ÖĞRENME VE BELLEK

Hayvanlara ve özellikle insana ait bir nitelik, davranışını deneyimlere göre değiştirebilme yeteneğidir. Öğrenme bunu gerçekleştirebilmek için bilgi kazanabilme, bellek bu bilgiyi koruma ve depolamadır. Açıkça görüleceği gibi bu iki olay birbiri ile yakından ilişkilidir ve her ikisinin birlikte ele alınması gerekir.

Fizyolojik bakış açısından bellek, net (eksplicit) ve gizli (implicit) olarak iki tipe ayrılabilir. Tanıma belleği veya deklaratif bellek olarak da adlandırılan net bellekte, bilinç eşleniktir ve hipokampus ile beyinin medial temporal loblarının diğer bölümlerinde depolamaya bağımlıdır. Olaylara (epizodik) ve sözcük, kural, dile ait (semantik) bellek olarak alt gruplara ayrılır. Gizli bellek uyanıklığı içermez ve buna varlığı anlaşılmayan veya refleksif bellek de denir. Bunun depolanması, en azından bazı durumlarda, hipokampusta işlemlemeyi içermez ve diğer şeylerin yanı sıra, beceri, alışkanlık ve koşullu refleksleri kapsar. Öte yandan, bisiklet sürme gibi etkinlikler, tam olarak öğrenilinceye kadar başlangıçta tanıma belleği oluşturup daha sonra refleksif belleğe geçer.

Eksplisit bellek ile implisit belleğin çeşitli formları şunları içerir:

- Saniyeler ile dakikalar boyu süren, bu sırada hipotalamustaki veya başka yerlerdeki işlemlerin, kavşak etkinliğindeki uzun süreli değişikliğe dayandığı kısa süreli bellek,
- Belleğin yıllarca ve bazen yaşam boyu depolandığı uzun süreli bellek.

Kısa süreli bellek sırasında anı kalıntıları travmalar ve çeşitli ilaçlarla bozulabilir, halbuki uzun süreli anı kalıntıları bozulmaya belirgin şekilde dirençlidir. Çalışan bellek, kişi bir bilgiye dayanan girişim planlarken bilgiyi hazır tutan kısa süreli bir bellek tipidir.

İmplicit bellek, bir kez kazanıldıktan sonra bilinçsiz ve kendiliğinden gerçekleşir hale geçen beceri ve alışkanlıkları kapsar. Bu bellek, daha önce karşılaşmış olma sonucu sözcük veya cisimlerin tanınmasını kolaylaştıran durumu da içerir. Bunun bir örneği, ilk birkaç harfin söylenilmesi sonucu bir kelimenin daha kolay hatırlanmasıdır. İmplicit belleğin diğer çeşitleri, asosiyatif olan ve olmayan formlara ayrılabilir. Asosiyatif olmayan öğrenmede organizma tek bir dürtü ile öğrenirken asosiyatif öğrenmede organizma bir dürtünün diğer dürtü ile olan ilişkisini öğrenir.

Alışkanlık (habitüasyon), nöral bir uyarının defalarca yinelenildiği basit bir öğrenme şeklidir. Bir uyarı ilk kez uygulandığında, o canlı için yeni olup bir tepkime uyandırır. Bu uyarı

Yinelenen uyaran, giderek daha az elektriksel cevap oluşturur. En sonunda denek uyarana alışır ve buna aldırış etmez. Duyarlanma (sensitizasyon) bir anlamda bunun tersi olan bir olaydır. Yinelenen uyaran, eğer hoş veya hoş olmayan bir başka uyaranla bir veya daha fazla birlikte verilirse daha büyük bir cevap meydana getirir. Uyarıların uyandırma değerinin benzeri yoğunlaşmasının insanda meydana geldiği bilinmektedir. Çeşitli tür gürültüler arasında uyuyan annenin bebeği ağlayınca hemen uyanması buna örnektir. Alışkanlık asosiyatif olmayan bir öğrenme örneğidir. Asosiyatif ğrenmenin klasik rneği koşullu reflekstir. Koşullu bir refleks, önceden cevap oluşturmıyan veya çok hafif bir cevap oluşturan bir dürtüye karşı, bu dürtünün, bu cevabı normal olarak uyandıran bir diğer dürtüyle tekrar tekrar eşleştirilmesiyle kazanılan bir refleks cevaptır [92].

Bellekte kilit ge, seçilmiş kavşak bağlantıların gücünde değişiklik olmasıdır. En basit olanlar hariç bütün bellek biçimlerinde, bu değişiklik protein sentezini ve genlerin etkinleştirilmesini içerir. Bu olay, kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe geçiş sırasında görülür. Hayvanlarda, her eğitim oturumunu izleyen beş dakika içinde anestezi uygulanır, elektroşok verilir veya protein sentezini bloke eden ilaç, antikor veya oligonükleotidler kullanılırsa, uzun süreli öğrenilmiş cevapların kazanılması önlenir. Bu girişimler, eğitim oturumlarından dört saat sonra yapılırsa kazanım üzerine herhangi bir etki görülmez. İnsanda bu olayların karşılığı, beyin sarsıntısı veya elektroşok tedavisinden hemen önce gerçekleşmiş olaylara ait belleğin yitimidir (retrograd amnezi). Bu amnezi, deney hayvanlarındakinden daha uzun dönemleri kapsarsa da uzak bellekler el değmemiş olarak kalır [92].

Hafıza ve öğrenme yaşla bağlantılı nörodejeneratif hastalıklarla bozulur. Bu hastalıkların belirli bölgelerde reaktif oksijen türlerinin aşırı bulunmasının bir sonucu olduğuna inanılır. Beyin, radikal oksijen oluşumunun nisbeten yüksek olması, kolaylıkla okside olabilen lipidlerin yüksek konsantrasyonlarda varlığı ve antioksidan savunma sisteminde nisbeten olan eksiklik yüzünden oksidatif strese hassastır [93,94,95].

1.5. DİABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus, insülin fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak ortaya çıkan karbohidrat, lipid ve protein metabolizma bozukluğu ile karakterize bir hastalıktır. Diyabetin komplikasyonları, insülin homeostazisi ve enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stresin bir sonucu olarak meydana gelmektedir [96].

Diyabet hastalığı zaman zaman asidoz ve komaya yol açmakla kalmamakta, uzun süren diyabette diğer komplikasyonlar da gelişmektedir. Bu komplikasyonlar uzun süreli hiperglisemi ile beraberdir ve kısmen dokularda sorbitol birikmesi ya da çapraz köprüler bulunan matriks proteinlerinde glikozillenmiş son ürünlerin oluşmasına bağlı olabilir. Diyabetin nedeni daima

insülin doku düzeyinde etkisinde bir eksiklik olması ise de bu eksiklik çeşitli anomalilere bağlı olabilir. Yani diyabet hastalığı pek çok nedenleri olan bir sendromdur. Diabetes mellitusun tip1 ve tip2 gibi sık rastlanan iki formu bulunur. Ayrıca diyabet, pankreasın cerrahi olarak çıkarılması, pankreasın beta hücrelerinin seçici yıkımına neden olacak uygun dozlarda alloxan, streptozotosin ya da diğer toksinlerin verilmesi, insülin sekresyonunu inhibe eden ilaçların verilmesi ve anti-insülin antikörlerinin verilmesiyle de oluşturulabilir. Tip 1 diyabet insülinine bağımlı bir diyabet hastalığı iken tip 2 diyabet insüline bağımlı olmayan ve ilerleyen yaşlarda ortaya çıkan bir diyabet hastalığıdır [97].

Diyabetik komplikasyonların oluşumu iki mekanizma ile açıklanmaktadır. İlk mekanizmada, özellikle iyi kontrol edilmeyen diyabette proteinlerin nonenzimatik glikozillenmesinin arttığı ve glikozillenen bu proteinlerin oksidasyonu sonucu serbest radikallerin oluştuğu savunulmaktadır. Plazma membran proteinleri ve insüliniden bağımsız glukoz alan lens gibi dokuların hücrelerindeki proteinler uzun süre yüksek konsantrasyonda glukoz ile karşı karşıya kalırsa, glukoz hızla proteinlerin amino gruplarına nonenzimatik bir yolla bağlanır. Bunun tipik örneği glikozillenmiş hemoglobindir [96,98].

İkinci mekanizmada, diabetes mellitusta artan kan glukozuna paralel olarak insüliniden bağımsız glukoz alan dokuların hücrelerinde glukoz konsantrasyonunun yükseldiği ve bu dokulardaki artmış glukozun fosforile olmadan enzimatik olarak sorbitol üzerinden fruktoza fazla miktarda dönüştüğü ve bunları metabolize etmeye yetecek kadar ilgili enzim olmadığından hücre içinde sorbitol ve fruktozun biriktiği iddia edilmektedir. Sorbitol ve fruktozun aşırı miktarda birikmesiyle meydana gelen osmotik değişimler bu doku ve organların yapısına bağlı olarak patolojik hallerin sebebi sayılmaktadır [96].

İnsüline bağımlı diyabet genellikle 25 yaşından küçük kişilerde ve ağırlıklı olarak 15 yaşından önce görülür. Bu tür diyabette insülin yetersizliği vardır. Hastalığın belirtileri aniden başlar, insülinin salgılandığı pankreasın Langerhans adacıkları üzerindeki beta hücrelerinin sayısı azalır, hatta bu hücre kaybı dolaşımdaki insülinin ortadan kalkmasına kadar devam eder. Total diyabet hastalarının yaklaşık % 10'u insüline bağımlıdır. Diyabet hastalığının otoimmün bir hastalık olduğu ve beta hücrelerinde tahribin meydana geldiği konusunda genel bir görüş birliği vardır [97,99].

Tip 2 diyabet genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkar. Bu tip diyabette insülin sekresyon yeteneği total olarak kaybedilmemiştir. Aynı zamanda beta hücrelerinin sayısı da normaldir. Bu nedenle bu form, yaşlılık diyabeti olarak isimlendirilir. Hastalığın başlangıcı ve varlığı belirgin değildir. Tip2 diyabette insülin salgılanmasının yetersiz oluşu hastalığın nedenlerinden biridir. Yavaş gelişme gösteren tip2 diyabette insülinin etkilediği doku hücre membranlarındaki insülin reseptörlerinin yetersiz olduğu bu yüzden glukozun hücrelere yeterince alınmaması ve

kullanılmaması durumuyla karşılaşılmaktadır. Bu durum tip2 diyabetin nedenlerinden biri olup vücutta insüline karşı bir direncin ortaya çıkması olarak tanımlanmaktadır [97,99].

Diyabet periferik ve merkezi sinir sisteminde yapısal ve fonksiyonel hastalıklara neden olur [100]. Öğrenme ve hafıza bozulması diabetes mellituslu erginlerde gözlemlenmiştir [101,102,103]. Diyabet kronik hiperglisemi yoluyla bilişsel bozukluklara yol açar [104]. Diyabetik hastaların beyinlerinde elektrofizyolojik ve yapısal anormallikler vardır ki bunların bilişsel bozukluklarla bağlantılı olduğu bilinmektedir [105,106].

1.5.1. Deneysel Diyabet ve Serbest Radikaller

Diyabetin ortaya çıkışında oksidasyonun rolü olduğuna dair bulguların çoğu deneysel diyabette kullanılan iki ilaç olan alloxan ve streptozotosin (STZ) ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bu kimyasal maddelerin her ikisi de oksidan madde meydana getirerek Langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip ederler. Hücre tarafından yeterli miktarda tutulan alloxan, askorbat ve tiollerle reaksiyona girerek onların antioksidan etkilerini engeller ve oksidanların üretimi ile beta hücre hasarına neden olur. Bir glukonitrozüre olan STZ'nin etki mekanizması ise daha az anlaşılmıştır. Ancak STZ'nin uygun olmayan Nitrik oksit (NO) cevapları meydana getirdiği, NO cevabının neden olduğu adacık hücre yıkımının artmasının diyabeti oluşturduğu düşünülmektedir. Diabetes mellitusun başlangıcında sıklıkla pankreas adacık hücrelerinde inflamasyon vardır ve bu inflamasyon insülitiste fagositlerden salınan serbest radikaller önemli rol oynar. Sitokinler de beta hücrelerinde serbest radikallerin oluşumuna yol açarlar [107,108,109,110]. STZ-diyabet insüline bağımlı tip I diyabet için bir deneysel model olarak karakterize edilir ve endojen kronik stresin örneğini sağlar [111,112]. STZ-diyabette ilerlemiş yapısal ve fonksiyonel anormalliklerin hem periferik hem de merkezi sinir liflerinde meydana geldiği tanımlanmıştır [113,114].

Oksidatif stres diyabetik komplikasyonlar ve diyabetin altında yatan bir mekanizma olarak değerlendirilir. Serbest radikaller sürekli olarak çevre uyarılarıyla etkileşim ve normal metabolik prosesin sonucu olarak vücutta üretilir. Fizyolojik şartlar altında antioksidanların büyük bir bölümü canlı ortamda serbest radikal üretiminin olumsuz etkilerine karşı vücudu korur [115]. Oksidatif stres, radikal üretimi ve radikal yok edici sistem arasındaki bir dengesizlikten kaynaklanır. Örneğin; serbest radikal üretiminin yükselmesi veya antioksidan aktivitesinin düşmesi ki her iki durumda da oksidatif stres meydana gelebilir. Diyabetlilerde protein glikasyonu ve glukoz otooksidasyonu sonradan lipid peroksidasyonunu katalizleyen serbest radikaller üretebilir [116,117]. Bunların yanı sıra diyabetlilerde antioksidan savunma sisteminin bozuklukları gösterilmiştir; antioksidan enzimlerde değişiklik, bozulmuş glutatyon mekanizması ve azalmış askorbik asit seviyeleri görülmektedir [118,119,120,121]. Ancak canlı

ortamda yüksek oksidatif stres asla açık olarak gösterilmemiştir. Tiyobarbütürik asit analiz maddesi (TBARS) kullanılarak hayvan ve insan modellerinde yapılan çalışmalarla diyabetik yapıda lipoproteinler ve membranlarda lipid peroksidasyonunun yükselmiş olduğu gösterilmiştir [122].

Oksidatif strese sebep olan serbest radikal gruplarından biri reaktif oksijen türleri (ROS)'dir. ROS diyabetlilerde yükselir. Bunun ana kaynakları glukoz otooksidasyonunun ve metabolitlerinin dahil olduğu metaboliklerdir. Bunların yanısıra ilerlemiş glikasyon, değişken prostanoid üretimi ve anormal veya etkisiz mitokondriyal fonksiyon vardır [123]. Periferik sinirler için ROS direkt olarak nöronları ve schwann hücrelerini tahrip edebilir ve diyabetle birlikte antioksidan koruma mekanizmalarını tehlikeye atar. Bu yüzden diyabetik ratlarda siyatik sinir lipid peroksidasyonu yükselmiştir ve süperoksit dismutaz seviyeleri (SOD) ve glutatyonun indirgenmiş formu (GSH), glutatyon peroksidaz ve redüktazda bir değişiklik olmamasına rağmen azalmıştır. Daha uzun bir dönemde bu dorsal sinir kökü gangliyonlarında son zamanlarda gözlemlendiği gibi onların mitokondrileri ve hücre yapıları üzerine kötü etkilerinin yanısıra demiyelinizasyon ve aksonapati gibi kümülatif nörodejeneratif değişikliklere yol gösterebilir. Ancak ROS ayrıca periferik sinirlerin dahil olduğu birkaç organın perfüzyonuna sebep olan kan damar fonksiyonu üzerine etki yapar. Bu, deneysel modellerde sinir fonksiyonunda en başta beliren bozukluklardan sorumludur ve iskemi-reperfüzyon etkilerini daha fazla ROS'a bağımlı olmasına sebep olarak sinir tahribini daha da arttıracaktır.

Nitrik oksit (NO) ROS için önemli bir vasküler hedeftir. Süperoksit NO'yu nötralize eder ve peroksinitrit formu endotel tahribe sebep olabilen hidroksil radikallerinin bir kaynağıdır. Bu yüzden oksidatif stres hiperglisemiye akut maruz kaldıktan sonra bile bazı deneysel preparatlarda açıkça görülen damar endoteliuma bağımlı gevşemeyi azaltır.

Kontrol edilmeyen hiperglisemili diyabet hastalarında kardiyovasküler hastalıklar, retinopati, nefropati ve nöropati gibi hastalıklara yakalanma riskleri daha büyüktür. Bu hastalıkların bazıları genetik, diğerleri membran glikasyonunun yükselmesi ve sorbitol akümüasyonu ve hiperglisemi tarafından sebep olunan aldoz redüktazın aktivasyonu ile bağlantılı olabilen bazı proteinlerle ilişkilidir. Protein glikasyonu, lipoproteinlerin oksidasyonu, trombosit kümeleşmesi ve kanın hiperkoagubilitesi gibi risk faktörleri bir ölçüde hipergliseminin direk sonuçlarına ve diabetes mellitusta vasküler hastalıkların gelişmesine farklı derecelerde katkıda bulunurlar.

Oldukça önemli bir metabolik düzensizlik olarak bilinen ve hiperglisemi ile karakterize edilen diyabet olgularında serbest radikal oluşumunda artış olmaktadır. Diyabette serbest radikal üretiminin arttığı ve radikal bağlayıcı sistemlerde azalma olduğu ileri sürülmüştür. Bu gelişmeler diyabet komplikasyonlarının patogeneğinde serbest radikallere olan ilgiyi arttırmıştır [96].

1.5.2. Diyabetik Ratlarda Öğrenme Eksiklikleri

Diyabetle birlikte ortaya çıkan oksidatif stres hafıza ve öğrenme bozukluklarına yol açar. Bu olaya serbest radikallerin etkisi büyüktür. Eğer diyabetin başlangıcında insülin pelletlerinin subkutan implantasyonu yapılırsa kan glukoz seviyeleri 25 mmol'den normal seviyesine (7 mmol) düşürüldüğü için tamamıyla öğrenme eksiklikleri önlenmiş olur. Ama bu uygulamaya diyabet uyarısından 10 hafta sonra başlanırsa ki bu zaman öğrenmenin bozulmuş olduğu zaman aralığıdır bu durumda sadece az miktarda gelişme vardır. Morris water-maze performansında yaşlı ratlarda görülen bazı bozukluklar, diyabetik serebral fonksiyon bozukluğu ve yaşlanma arasında bir etkileşimin var olduğunu göstermiştir ki bu bozukluklar genç-ergen ratlarda umulan etkilerden daha büyüktür [124].

STZ-diyabetik ratlarda diyabet uyarısından 10 hafta sonra Morris water maze'de öğrenme eksiklikleri görünmeye başlamıştır [124,125]. İşin uzaysal versiyonuna bakıldığında ise diyabetik ratların Morris water mazedde son eğitimlerinde bile ısrarla havuzun kenarlarına kaçmaya teşebbüs ettikleri yapılan çalışmada gözlemlenmiştir. Ancak diğer taraftan kontrol ratları böyle bir davranış sergilememişlerdir. Bu, diyabetik ratların kontrollerden daha düşük düzeyli anlayışa sahip olduğuna işaret eder [125].

1.5.3. Oksidatif Stresin Hafıza ve Öğrenmeye Etkisi

Hafıza ve öğrenme yaşla bağlantılı nörodejeneratif hastalıklı kişilerde bozulur. Yaşla birlikte insan anlayışının nörolojik karışıklıklar tarafından takip edilen dejenerasyonuna sinir sisteminin oksidatif tahribi tarafından sebep olunabileceği düşünülmüştür. Beyin ve sinir sisteminin, fazla miktarda oksijen kullanan lipit bakımından zengin nöral parankimadan yüksek oranda içermesi ve düşük antioksidatif enzimlere sahip olmaları yüzünden peroksitlerin tahribine karşı diğer dokulardan daha fazla hassas oldukları düşünülmektedir [126,127]. Beyinin yaşlanmasıyla ilgili son çalışmalarda Alzheimer hastalığının yanısıra normal olarak beyin yaşlanması boyunca oksidatif tahribin arttığı gösterilmiştir [128,129]. Motor fonksiyonları ve bilişsel kontrol için düşünülen serebral korteks ve hipokampus oksidatif strese oldukça hassas olarak görülürler ve antioksidanlara ihtiyaç duyarlar [130]. Oksidatif strese maruz kalan ratlarda, serebral korteks ve hipokampusun sinapslarında süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesinin normal ratlarla karşılaştırıldığında yükseldiği, katalaz aktivitesinin düştüğü rapor edilmiştir [68]. Deneysel olarak meydana getirilmiş oksidatif stresle serebral korteks ve hipokampusun tahribiyle neden olunan nörodejenerasyonu engellemek için melatonin ve vitamin E gibi antioksidanların kullanımının önemi tespit edilmiştir [57,66,131,132].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ratlarda oksijen eksikliği durumunda elektron mikroskopuyla gözlemlenen değişikliklere sinaptik veziküllerin normal olmayan akümüasyonu, sinir hücre çekirdeklerinin deforme olması ve şişmiş mitokondriler gibi örnekler verilebilir. Bu bulgular nörotransmisyon fonksiyonunda bir eksikliğin olduğuna işaret eder [128,133].

Hiperglisemi ile uyarılan oksidatif stres, diyabetin en sık gözlemlenen komplikasyonlarından biri olan diyabetik nöropatinin gelişmesini sağlar [134,135]. Serbest radikaller, lipit, nükleik asit, karbohidrat gibi biyolojik makromoleküllerle etkileşirler ve oksidatif strese sebep olarak diyabetle bağlantılı nöropatolojiye katkıda bulunan nöronal ölümü meydana getirirler [136]. Diabetes mellitus'ta antioksidan kullanımı ve oksidatif stresin rolleri çok sık olarak çalışılmıştır [137,138].

1.6. MELATONİN

İlk kez 1958 yılında Lerner ve arkadaşları tarafından bir çalışmada pineal bezden salgılanan bir hormon tespit edilmiştir. Kurbagalardaki melanofor hücrelerini etkilediği için “melatonin” adı verilmiştir [139]. Diğer pineal indollerine kıyasla hakkında çok daha fazla bilgi sahibi olduğumuz melatonin'in temel fizyolojik fonksiyonları uyku, davranış ve sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesi ile immün sistem ve reproduksiyon ile ilişkili etkileridir [140,141,142]. Yine, nörotropik bir özelliğe sahip olduğu ve bu nedenle de bellek fonksiyonu ile de ilişkili olduğu artık bilinmektedir [143].

Pineal bezin başlıca hormonu olan melatonin, vücut fonksiyonlarını ışık-karanlık ritmine göre düzenlemede önemli bir role sahiptir. Büyük oranda gece salgılanması sebebiyle karanlık hormonu olarak da bilinir. Gece maksimum, gündüz ise minimum düzeydeki salınımı ile “sirkadiyen salınım ritmi” göstermektedir [144,145,146]. Bu nedenle serum melatonin konsantrasyonu geceleri yüksek, gündüzleri ise düşüktür [147]. Laboratuvarında, fotik stimülasyon uygulanan hayvanlarda karanlığın başlamasından 8 saat sonra melatonin düzeyi maksimum değerine ulaşmıştır. Melatonin salgılanması, akşam başlamakta, gece yarısı maksimum düzeyine ulaştıktan sonra sabah azalma göstermektedir [148]. Sistemik kan dolaşımı, pineal bez, beyin-omurilik sıvısı, idrar ve hücre içindeki melatonin konsantrasyonu geceleyin gündüz ölçülen düzeyinin 10 katına kadar ulaşabilen bir artış göstermektedir [148,149].

1.6.1. Melatoninin Salınım Kontrol Mekanizmaları ve Sentezi

Göze gelen fotik stimülasyon sonucu retinohipotalamik traktuslar ile hipotalamustaki suprakiazmatik nukleus aktive olmaktadır. Daha sonra spinal kord yolu ile süperior servikal

gangliona gelen pre-ganglionik lifler de ganglion hücrelerine ait post-ganglionik sempatik lifler pineal sap yolu ile pineal bezdeki pinealosit hücreleri ile sinaptik bağlantılar yapmaktadır. Sözü edilen sinaptik iletimde rol oynayan transmitter norepinefrindir. Pinealositler arasına norepinefrin salınımı ile onların sekretuar fonksiyonları başlatılmaktadır [150].

Pineal bez ile sistemik dolaşım arasında kan-beyin bariyeri bulunmadığı için, kandaki triptofan pinealositlere kolayca ulaşabilmektedir [151,152]. Aktif transport ile pinealosit sitoplazması içine alınan triptofan'dan triptofan 5-hidroksilaz enzimi etkisiyle 5-hidroksitriptofan oluşur. Bu da 5-hidroksi triptofan dekarboksilaz enzimi tarafından 5-hidroksi triptamin (serotonin)'e dönüştürülmekte ve N-asetil transferaz (NAT) enzimi etkisiyle N-asetil serotonin'e dönüşmektedir. Daha sonra, N-asetil serotonin ise; hidroksi indol-O-metil transferaz (HIOMT) enzimi yardımıyla, N-asetil 5-metoksitriptamin (melatonin) haline gelmektedir [150,153,154].

Kural olarak, pineal bezde serotonin miktarı gündüz yüksek ve gece düşük düzeylerde iken, melatonin miktarı ise serotoninin tam tersi bir ritm göstermektedir. Gece pineal bezdeki serotonin miktarının azalmasının nedeni; melatonin sentez ve salınımının geceleyin artış göstermesidir. Bu bağlamda, melatonin sentezinde; pineal bez ve retina'da bulunan iki enzim önemli bir rol oynamaktadır: NAT enzimi ile HIOMT enzimi. Bu enzimlerin salınımı; gündüz ışıktaki azalmasına karşın, gece karanlıkta 100 kata ulaşan bir artma göstermektedir [140,141,154].

Gündüz, pineal bez ve presinaptik terminallerde serotonin miktarı maksimum düzeyde olup sürekli depolanmaktadır [148]. Gece ise, suprakiazmatik nükleus'tan gelen uyarı sonucu postsinaptik aralıkta norepinefrin salınımı maksimum düzeyde olmaktadır. Norepinefrin'in % 85'i postsinaptik pinealosit membranı'nda bulunan beta adrenerjik reseptörlerine ve geri kalan % 15'i ise alfa adrenerjik reseptörlerine bağlanmaktadır. Norepinefrinin hücre membranına bağlanması sonucu adenilat siklaz enzimi aktive olmakta ve oluşan cAMP ile melatonin sentezinde rol oynayan NAT enzimi aktifleşmektedir. Bu da, melatonin sentezinde önemli ölçüde bir artışa neden olur. Eğer hem alfa ve hem beta adrenerjik membran reseptörleri stimüle olur ise cAMP miktarı ve melatonin sentezinde artış olmaktadır. Pinealositlerde üretilen melatonin; çok hızlı bir şekilde bu hücrelerin komşuluğunda yer alan kapillerlere bırakılmak suretiyle sistemik kan dolaşımına karışmaktadır [141].

1.6.2. Melatoninin Yaşla İlişkisi

Yaşlanma ile melatonin sentez ve salınımında azalma olmaktadır. Yine günlük sirkadiyen salınım ritmi de bozulmaktadır [141]. İnsanlarda, melatonin salınımı adolesan çağda maksimum düzeyine ulaşmakta ve giderek azalarak yaşlılarda minimum düzeyine inmektedir. Erişkin bir

insanda geceleyin ölçülen serum melatonin düzeyi 50-70 pg/ml'dir [141,152]. Yaşlılarda günlük sirkadiyen salınım ritmi tama yakın kaybolmakta ve geceleyin melatonin düzeyinde artık artış olmamaktadır [141,148,155]. Deney hayvanlarında da hayvan yaşlandıkça sirkadiyen ritmin bozulduğu, gündüz ve geceye ait serum melatonin düzeylerinin hemen hemen eşit bir hale geldiği saptanmıştır. Yeni doğan sıçanlarda da pineal bezden çok az miktarda melatonin salgılandığı bildirilmiştir [141,151].

Melatonin hormonu hedef dokulardaki etkisini, bu dokularda yer alan "spesifik reseptörler" aracılığı ile göstermektedir. Hedef doku nöral bir yapı (beyin, retina, hipofiz gibi) ya da ekstra-nöral bir yapı (tiroid, timus, dalak, endometriyum, plasenta, gastrointestinal sistem, eritrosit, lökosit, neoplastik doku) olabilir [154,156]. Sözü edilen reseptörlerin de melatonine benzer şekilde sirkadiyen bir ritm ile fonksiyon gösterdiği saptanmıştır [141]. Yine hücre membranındaki melatonin reseptörlerine ilaveten nukleusta da benzer reseptörlerin yer aldığı ve DNA üzerinde bir etki oluşturduğu ileri sürülmüştür [154,157].

1.6.3. Melatoninin Sinir Sisteminde ve Kanda Dolaşımı

Lipofilik özelliği nedeniyle, vücuttaki tüm doku ve sıvılara kolayca dağılmaktadır. Pineal bezde kan-beyin bariyeri olmadığı için, salgılanan melatonin direkt olarak sistemik kan dolaşımı ve BOS içine karışmaktadır [150]. En çok kabul gören hipoteze göre; pineal bez içinde sentezlenen melatonin, önce Galen veni içine ve daha sonra sağıtal sinüs ve juguler ven yolunu izleyerek kalbe ulaşmaktadır. Karotid arterler yoluyla da spinal kord ve beyin dokusundaki nöral yapılara ulaşmaktadır. Diğer bir hipoteze göre ise, ventriküler sistem içindeki BOS aracılığı ile beyin ve spinal kord gibi nöral yapılarda yer alan hedef dokulara ulaşmaktadır [149,158]. Klinik bir tablonun bir ögesi olarak ya da deneysel olarak sempatik sinirlerin kesilmesi, ganglionektomi ya da pinealektomi durumlarında; melatonin sentez ve sirkadiyen salınım ritminin bozulması sonucu, geceleyin pineal bez ve sistemik dolaşımdaki melatonin düzeyinde artış olmamaktadır [150,159].

Pineal bezden sistemik kan dolaşımına verilen melatoninin 2/3'ü albumin'e bağlı ve geri kalan 1/3'ü ise serbest olarak taşınmaktadır. Primer olarak karaciğer ve sekonder olarak da böbrekte metabolize olmaktadır. Karaciğerde melatonin mikrozomal enzimler tarafından 6-hidroksimelatonin'e dönüştürülerek deaktivasyon-detoksifikasyona uğratılmakta ve idrarla atılmaktadır [141,152].

Melatoninin sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesinin yanı sıra, antioksidan, analjezik, immün sistemi uyarıcı etkilere de sahip olduğu gösterilmiştir.

1.6.4. Melatoninin Serbest Radikal Giderici Antioksidan Etkisi

Aerobik solunum esnasında, kullanılan oksijen'in % 1'i "serbest radikal" adı verilen ve ileri derecede reaktif olan; hidroksil radikali, hidrojen peroksit radikali, superoksit anyon radikali ya da singlet oksijen radikali adı verilen toksik maddeler oluşturmaktadır [152,160,161]. Bu radikallerden "hidroksil radikali" hücre zarında bulunan membran fosfolipidleri ile "lipid peroksidasyonu" adı verilen bir reaksiyona girmek suretiyle, malondialdehit (MDA) adı verilen bir ürünün oluşmasına neden olmaktadır. Oksidatif stres adıyla da bilinen bu reaksiyon sonucu, hücre membranının stabilitesi bozulmakta ve hücre içinde fazla miktarda kalsiyum birikmesi neticesinde hücre ölümü olmaktadır [141,152,155,160,161].

Öte yandan vücutta serbest radikallerin neden olduğu değişik toksik durumların düzeltilmesi için enzimatik (sitokrom oksidaz, katalaz, glutatyon peroksidaz vb. gibi) ya da enzimatik olmayan (vitamin E, vitamin C, vitamin A vb. gibi) antioksidanlar görev yapmaktadır [141,152,160,161]. Melatonin de organizma için en zararlı radikal olan "hidroksil radikali"ni ve böylece de "lipid peroksidasyonu" reaksiyonunu engelleyen güçlü bir antioksidandır. Vücuda her yoldan uygulanabilen, hızla absorbe olabilen ve ileri derecede "lipofilik" özelliği nedeniyle tüm dokulara kolayca difüze olabilen bir maddedir. Melatonin hem direkt hem de indirekt olarak etki eder. Direkt olarak serbest radikalleri giderir, indirekt olarak antioksidan fonksiyon gösterir [162].

Melatonin; hidroksil radikali ve peroksil radikalini detoksifiye eder. Süperoksit anyon radikalının direkt olarak yakalanmasında az etkilidir. Süperoksitin parçalanmasında görevli olan süperoksit dismutaz enziminin mRNA düzeyini artırır. H_2O_2 ' yi uzaklaştıran katalitik fonksiyonlu esansiyel bir enzim olan glutatyon peroksidaz aktivitesini artırır. Melatonin diğer radikal yakalayıcılarından daha hızlı bir şekilde $OH\cdot$ 'i yakalar. Böylece OH tarafından oluşturulan DNA hasarını azaltmaktadır. Makromolekülleri oksidatif stresten koruması DNA ile sınırlı değildir. Melatonin uygulaması, antioksidan enzimlerin mRNA' sını artırmaktadır [163].

Serbest radikal giderici etki için herhangi bir membran reseptörü bağlantısına ihtiyaç göstermediği iddia edilmektedir. Bu nedenle melatonin diğer serbest radikal giderici antioksidanlardan çok daha güçlü bir madde olup, antioksidan özelliği glutatyondan 5 kez ve mannitol'den ise 15 kez daha etkindir [164,165]. Melatonin, hem hücre membranı ve hem de hücrenin nukleusunda serbest radikallere karşı sürekli bir şekilde savaş halindedir. Melatoninin oksidatif strese maruz bırakılan eritrositlerin içine girmek suretiyle hücreyi koruduğu saptanmıştır [161]. Yine nitrik oksitin neden olduğu lipid peroksidasyonu da melatonin verilerek suprese edilebilmektedir. İskemi-perfüzyon durumlarında da serbest radikal ve lipid peroksidasyonu oluşumunun melatonin verilerek önemli ölçüde azaltıldığı saptanmıştır [166].

Melatonin hem serbest radikalleri etkisiz hale getirerek, hem de antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak oksidatif stresi azaltmaktadır. *İn vitro* çalışmalarda vitamin E, vitamin C ve indirgenmiş glutatyon gibi antioksidanlar ile melatonin karşılaştırılmış, vitamin E'den iki kat etkili bulunmuştur. Ayrıca iskemi-reperfüzyon sonrası aşırı serbest radikal oluşmasını engelleyerek, başta sinir dokusu olmak üzere diğer organlarında da koruyucu bir etkiye neden olmaktadır [152].

Melatoninin doku rejenerasyonu üzerine olan olumlu etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla değişik doku türleri kullanılmıştır. Doku rejenerasyonu ve hücrel mitotik aktivite üzerine "hızlandırıcı" bir etki göstermektedir. Diğer yandan pinealektomi uygulanan hayvanlarda doku kollajen içeriğinde artış olduğu ve melatonin verilince de kollajen yapımının baskılandığı bildirilmiştir. Deneysel nörodejenerasyon modellerinde, hayvana melatonin verilince serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonunun engellendiği tespit edilmiş, dejenerasyon gelişmesi önlenmiştir [167].

Melatoninin beyin fonksiyonları üzerinde depresif bir etki gösterdiği saptanmıştır. Yine antioksidan bir etki göstermesi nedeniyle nöroprotektif bir özelliğe sahiptir. Öte yandan GABA üzerinden etki etmek suretiyle homeostatik sistem kontrolünde de rol aldığı düşünülmektedir. Melatonin hem hidroksil ve hem de peroksil radikallerini giderici antioksidan özelliği nedeniyle nöronal aktivite üzerindeki analjezik, antikonvülsif ve depresif etkileri ile nöroprotektif bir ajandır [167,168]. Oluşumundan serbest radikallerin sorumlu tutulduğu bir çok merkezi sinir sistemi hastalığı (alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı vb.), ateroskleroz ve immün sistem hastalıklarına melatonin sentez ve salınımının azalma gösterdiği, yaşlılık döneminde rastlanmaktadır. Bu nedenle klinikte bu hastalıkların tedavisinde melatonin kullanımı tavsiye edilmektedir [154,166].

1.7. VİTAMİN E

Vitamin E, tokoferol yapısında olup ilk olarak Evans ve Sure tarafından tanımlanmış ve 1938 yılında izole edilmiştir [169]. Plazma ve tüm hücrel membranlarda bulunan bir lipit-faz antioksidanıdır. Tokoferollerin en potent üyesi α -tokoferoldür. Temel rolü, radikalleri daha az aktif formlara dönüştürerek membranları lipit peroksidasyonuna karşı korumaktır. E vitamini yağ ve yağlı gıdalarda bulunmaktadır. Fındık ve badem iyi birer E vitamini kaynağıdır [170]. Hücrelerde membran fosfolipitlerinin doymamış uzun zincirli yağ asitlerinin ışık ya da havanın etkisiyle oluşturdukları lipit peroksidasyonunda ortaya çıkan serbest radikal oluşum zincirini membranda önleyen ve oluştuğunda nötralize eden en güçlü antioksidan faktör E vitaminidir. E vitamini membran fosfolipitlerinin peroksidasyonunu engelleyen birinci sıra savunma hattını oluşturur. Onu destekleyen gerideki savunma sistemlerinden glutatyon peroksidaz molekülünde

fonksiyonel önemi olan bir öge selenyum iyonudur. Selenyum vücutta E vitamini gereksinimini düşürür [171].

Vitamin E' nin 8 adet tokoferol formu bulunmaktadır. Bunlardan α - tokoferol en aktif olanıdır. Başlıca fonksiyonu; hücre membran fosfolipitlerinde bulunan poliansature yağ asitlerini ve özellikle LDL' yi serbest radikallerin oksidasyonundan korumaktır. Zincir kırıcı antioksidan olarak bilinir [172].

E vitamini, özellikle son yıllarda güncel olan ve bu nedenle de araştırmacılar tarafından incelenen antioksidandır. Antioksidan etkileri ile toksik oksidasyon ürünlerinin şekillenmesini önler . E vitamini ve diğer antioksidanlar lipid peroksidasyonunu engellerler. Ayrıca E vitamini membran lipidleri üzerindeki etkisiyle eritrosit membran stabilitesini artırır. Aynı etkiyi muhtemelen diğer hücrelerde de gösterir [173].

E vitamini serbest radikali ortadan kaldırırken kendisi, göreceli olarak kararlı ve normal şartlarda tek başına lipid peroksidasyonu başlatamayacak kadar inaktif bir form olan tokoferoksil radikale dönüşmektedir. Bu olay bir antioksidan için zorunlu bir kriter olduğu için E vitamininin iyi bir antioksidan olduğu söylenebilir. Vücudun diğer antioksidan sistemleri (C vitamini, glutatyon peroksidaz ve β -karoten gibi) lipid peroksidasyonu üzerinde E vitamini kadar etkili değildirler. Bir molekül α -tokoferol, 100 molekül yağ asidinin peroksidasyonunu engelleyebilir [171]. Oluşan, reaktif olmayan E vitamini radikali, glutatyon veya C vitamini ile tekrar aktif hale getirilmekte veya diğer bir tokoferoksil radikaliyle reaksiyona girerek molekül oluşturmakta, ya da stabil bir quinon formuna dönüştürülmektedir. E vitamininin az da olsa toksik potansiyel taşıdığı ifade edilse de metabolik olarak normal olan insanlarda E vitamini eksikliği veya toksisitesi nadir olarak görülmektedir [174].

Önemli bir endojen ve eksojen antioksidan olarak hücrel ve hücre içi membranların bütünlüğünün korunması E vitaminin başlıca fonksiyonlarından biridir. Lipidde çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle kolayca membran fosfolipidlerine diffüze olabilmekte ve 20 karbonlu doymamış yağ asitlerini indirgeyerek serbest radikallerin biyomembranlarda oluşturabileceği lipid peroksidasyonunu önlemektedir [175].

Oksidatif stresin etkisi ve antioksidanlarla yapılan çalışmalar esas olarak nöronlar üzerine odaklanmıştır. Diyabet, dokularda serbest oksijen radikal düzeyini artırır. Artan serbest oksijen radikalleri hücre membranı lipid peroksidasyon düzeyini arttırarak DNA hasarına ve nöronal hücre ölümüne neden olur. Serbest oksijen radikallerinin hasar şiddetini azaltmak için farklı antioksidan terapileri iyi yönde etki etmektedir. Vitamin E'nin LPO düzeyini azalttığı belirtilmiştir. Vitamin E nöronlar üzerinde direkt koruyucu etkiye sahiptir. Vitamin E'nin etkisi iki yönlüdür. Birincisi LPO düzeyini düşürerek membranı korumakta ikincisi intrasellüler

antioksidan olan glutatyon ve glutatyon metabolizmasını sağlayan enzimleri ve bu enzimlerin aktivitelerini artırmaktır [131,176].

Hayvan ve insan dokularında en az etkili olan tokoferol γ tokoferoldür. Bunun yanında α -tokoferol (5,7,8-trimetiltokol), hayvan dokularında tokoferollerin yaklaşık % 90'ını içerdiği ve biyolojik aktivitede en fazla rol oynadığından dolayı en önemli tokoferol sayılmaktadır. Bu madde doğal olarak "d" izomeri halinde bulunur ve bu şekli ilaç olarak kullanılır. E vitamininin grupları oda sıcaklığında yarı sıvı yağlardır. Yağ çözücülerde çözünür ve oksijen yokluğunda sıcak olup, asite dayanıklıdır. α -tokoferol için maksimum absorpsiyon 294 nm'dedir [171].

Diabetes mellituslu hastalarda E vitamini seviyeleri sağlıklı kontrollere oranla önemli ölçüde düşük bulunmaktadır. Yaşlı hastalarda bu değer daha da düşük bulunmuştur. Bulgular, bu hastalarda E vitamini eksikliğinin ciddi bir boyutta olduğunu, E vitamini alımı ile bu eksikliğin önemli ölçüde düzeleceğini göstermektedir. Diyabet hastalığında oluşan oksidatif stres üzerine E vitamininin etkisi incelendiğinde, optimal kontrol ile düşmekte olan oksidatif stresin, E vitamini alımından sonra daha da düştüğü gözlenmiştir [171].

Serbest radikal yok edicisi olan vitamin E'nin deneysel nörodejeneratif şartların çoğuna karşı nöronları koruduğu bilinmektedir [177]. Vitamin E'nin membranların peroksidatif tahribini önleme ve serbest radikalleri etkisizleştirme yeteneğine sahip olduğu bilinir. Vitamin E'nin beyinde *in vitro* şartlar altında lipit peroksidasyonunu engellediği gösterilmiştir. Bu durum vitamin E'nin lipitte çözünebilir bir antioksidan olmasından ve bu nedenle hücre membranlarının hidrofobik yüzeylerinde yoğunlaşmasından kaynaklanır [178,179].

İlk olarak tarafımızdan yapılacak bu araştırmadan elde edilecek sonuçlar orijinal bulguları sağlayacaktır. Buna göre diyabetik rat beyininin farklı bölgelerinde NCAM protein ekspresyonu incelenecek ve buna melatonin ve E vitamininin etkisi araştırılacaktır. Diyabetin oluşturduğu doku hasarı ve bu hasarda serbest oksijen radikallerinin rolü ve etkinliği son yılların en önemli araştırma konularından birisidir. Çalışmamızda kullanılacak antioksidanların insanlarda denenmeden önce model deney hayvanı olarak ratlarda uygulanması planlanmıştır. Böylece diyabetik ratlarda NCAM protein ekspresyonundaki değişimin moleküler düzeyde araştırılması, öğrenme ve bellek bozukluklarına neden olabilecek bu değişimin tıbbi tedavi yöntemlerine katkıda bulunmak amacıyla önem arz etmektedir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Deney Hayvanları

Deneylerde kullanılan Wistar-albino cinsi ratlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden temin edildi. Ratlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler, özel çelik kaplarda ve su da paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikasında özel olarak hazırlanan pelletler halindeki rat yemleriyle beslendi. Ratlara verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 2.1’de gösterilmiştir. Ratların deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

Tablo 2.1. Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi

Yem maddeleri	Yüzdesi (%)
Buğday	10
Mısır	21
Arpa	14
Kepek	8
Soya Küspesi	25
Balık Unu	8
E-Kemik unu	4
Melas	4
Tuz	4
*Vitamin Karması	1
**Mineral Karması	1

*Vitamin karması: Deney hayvanlarına verilen yemlerin vitamin karmasında A, D3, E, K, B1, B2, B6, B12 vitaminleri ile nikotinamid, folik asit, D-biotin ve kolin klorit bulunmaktadır.

**Mineral karması: Mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt, selenyum ve kalsiyumdan oluşmuştur.

2.2. Deneysel Uygulamalar

Deneysel çalışmalara başlamadan önce, çıkabilecek aksaklıkların asgariye indirilmesi amacıyla ön çalışma yapıldı. Deney hayvanlarının bulundukları ortamın sıcaklığı 22-25 °C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat ışık altında ve 12 saatte karanlıkta takip edildi. Deneysel çalışmalarda ortalama ağırlıkları 220 gr (220 ±40 gr) olan toplam 60 adet Wistar-Albino cinsi erkek ratlar kullanıldı. Ratlar rastgele seçilerek 4 grup oluşturuldu. Bu gruplar;

1. **Grup:** Kontrol grubu (n=15)
2. **Grup:** STZ grubu (n=15)
3. **Grup:** STZ + Melatonin grubu (n=15)
4. **Grup:** STZ + Vitamin E grubu (n=15)

Mevcut laboratuvar şartlarımızda, deneysel diyabet oluşumunun kaçınıcı günlerde meydana geldiği gözlemlenerek deneysel uygulama başlatıldı. Çalışmanın başlangıcında ve her hafta düzenli bir şekilde ağırlık değışiklikleri kaydedildi.

1. Kontrol Grubu: 15 adet rattan oluşan bu gruba 7 haftalık uygulama boyunca hergün intraperitoneal enjeksiyonla 0.1 ml serum fizyolojik verildi. Gruptaki ratların bazal ve 7 hafta sonra örneklerin alınması öncesinde olmak üzere toplam 2 kez kan şekerlerine bakıldı.

2. STZ Grubu: 15 adet rattan oluşan bu gruba STZ, 50 mg/kg olacak şekilde 0.1 M fosfat-sitrat tamponunda (pH:4.5) çözdürölerek intraperitoneal enjeksiyonla tek doz olarak uygulandı. Bir hafta sonra kuyruk veninden alınan kanın glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukozu 250 mg/dl'yi geçen ratlar, diyabetik olarak kabul edildiler. Deneklerin açlık kan glukoz düzeylerini saptamak için kan örnekleri, 12 saatlik açlık sonrasında sabah 9.00 – 10.00 arasında alındı. Haftada iki kez kan glukozuna bakıldı. Ratlara 7 haftalık uygulama boyunca hergün intraperitoneal enjeksiyonla 0.1 ml serum fizyolojik verildi.

3. STZ+ Melatonin grubu: İkinci grupta olduğu gibi diyabetik hale getirilen 15 adet ratın haftada iki kez düzenli olarak kan glukozuna bakıldı. Melatonin (Sigma) % 0.1 alkol içeren serum fizyolojikte hazırlanarak her bir rata 10 mg/kg/gün dozunda karanlık periyoda geçmeden hemen önce intraperitoneal enjeksiyonla verildi. 7 hafta boyunca uygulamaya devam edildi.

4. STZ+ Vitamin E grubu: İkinci grupta olduğu gibi diyabetik hale getirilen 15 adet ratın haftada iki kez düzenli olarak kan glukozuna bakıldı. Vitamin E (α -tocopherol, Sigma) zeytinyağı (olive oil, Sigma) içerisinde çözdürölerek her bir rata 125 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal enjeksiyonla verildi. 7 hafta boyunca uygulamaya devam edildi.

2.3. Hipokampus ve Korteks Örneklerinin Alınması

Deneysel uygulamalar sonrasında etik kurulun aldığı kararlara uygun olarak dekapite edilen ratların total beyinleri alınarak, beyinin farklı bölgeleri (Hipokampus ve Korteks) ayrılarak kuru buzda hemen donduruldu. Örnekler darası alınmış olan eppendorf tüplere aktarıldı. Ağırlıkları hassas terazide tartılarak belirlendi ve analizler yapılınca kadar -70 °C'de saklamaya alındı.

2.4. Hipokampus ve Korteks Örneklerinin Hazırlanması

Hipokampus ve korteks örneklerinin hazırlanmasında Baydaş ve arkadaşları tarafından uygulanan homojenizasyon yöntemi kullanıldı [93]. Taze veya dondurulmuş dokular 1:10 (w/v) oranında homojenizasyon solusyonunda [10mM Tris- HCl (pH=7.4), 0.1 mM NaCl, 0.1mM fenil metil sülfonil florid (PMSF), 5µM soybean (bir tripsin inhibitörü olarak)] cam bir homojenizatör yardımıyla soğuk ortamda homojenize edildi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 60 dakika süreyle 60.000 x g'de santrifüj edildi. İlk süpernatantlar eppendorf tüplere alınarak LPO ve GSH analizleri yapılınca kadar -70 °C'de saklandı. Pelletler eşit hacimde ilave edilen homojenizasyon solusyonunda [25 mM Tris-HCl (pH= 7.4), 0.1mM PMSF, % 2'lik TritonX -100 ve % 1'lik SDS] yeniden süspanse edildi. +4 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı ve homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4 °C'de 60 dakika süreyle 60.000 x g'de santrifüj edildi. Elde edilen 2. süpernatantlar eppendorf tüplere alınarak SDS-PAGE ve western blot analizleri için -70 °C'de saklandı.

2.5. Hipokampus ve Korteks Örneklerinde Lipit Peroksidasyonu (LPO) Ölçüm Yöntemi

Doku lipit peroksidasyonu; malondialdehit (MDA) + 4-hidroksialkenal (4-HDA) seviyeleri, LPO-586 (Oxis International, Inc., Portland, USA) ticari kiti kullanılarak tespit edildi.

Kullanılan maddeler:

- Ayıraç I (R1); Asetonitrilde hazırlanmış 10.3 mM N-metil-2-fenil indol
- Ayıraç II (R2); 15.4 metansülfonik asit
- 4-HNE standart solusyonu (S1); Asetonitrilde hazırlanmış 10 mM 4-hidroksinonenal
- MDA standart solusyonu (S2); 20 mM Tris-HCl (pH: 7.4) solusyonu ile hazırlanmış 10 mM 1,1,3,3-tetrametoksipropan

Yöntem:

- Standart solusyonlarının hazırlanması:

Standart konsantrasyonu (µM):	0	2,5	5	10	15	20
	(Kör)					
Standart 100 µM (µl):	0	25	50	100	150	200
Distile su (µl):	200	175	150	100	50	0

- Kör, standart ve örnekler için polipropilen mikrosantrifüj tüpleri hazırlandı.
- Standartlar için hazırlanmış tüplere değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış standart solusyonlarından 200 µl ilave edildi.
- Kör için hazırlanmış tüpe 200 µl su ilave edildi.

- Örnekler için hazırlanmış tüplerin herbirine 200 µl örnek ilave edildi.
- Kör, standart ve örnek tüplerinin herbirine asetonitrilde hazırlanmış 0.5 M Bütilat hidroksitoluen (BHT) solusyonundan 10 µl ilave edildi.
- Kör, standart ve örnek tüplerinin herbirine 650 µl R1 ayıracından eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı.
- Kör, standart ve örnek tüplerinin herbirine 150 µl R2 ayıracından eklendi ve tüplerin ağzı kapatılarak vorteksle iyice karıştırıldı.
- 45 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 45 dakika inkübasyon yapıldı.
- Tüpler mikrosantrifüjde 15000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar dikkatlice ayrıldı.
- Süpernatantlar küvetlere aktarıldı ve absorbensları 586 nm'de spektrofotometrede okundu.
- Örneklerin okunan absorbens değerleri kitte verilen formül kullanılarak ve dilüsyon oranları göz önünde bulundurularak hesaplandı.

2.6. Hipokampus ve Korteks Örneklerinde Glutasyon (GSH) Ölçüm Yöntemi

Örneklerdeki Glutasyon (GSH) seviyeleri, GSH-400 (Oxis International, Inc., Portland, USA) ticari kiti kullanılarak tespit edildi.

Kullanılan maddeler:

- Ayıraç I (R1); 0.2 N HCl de hazırlanmış 1.2×10^{-2} M kromojenik ayıraç solusyonu
- Ayıraç II (R2); % 30 NaOH
- Tampon solusyonu (S3); 0.2 mM dietilen triamin penta asetik asit (DTPA) ve % 25 (w/v) lubrol içeren 20 mM potasyum fosfat (pH: 7.8) solusyonu

Yöntem:

- Standart solusyonlarının hazırlanması:

Standart konsantrasyonu (µmol/L):	0	20	40	60	80	100
	(Kör)					
Tampon S3 (µl):	900	860	820	780	740	700
GSH çalışma solusyonu (0.5 mmol) (µl):	0	40	80	120	160	200

- Kör, standart ve örnekler için polipropilen mikrosantrifüj tüpleri hazırlandı.
- Standartlar için hazırlanmış tüplere değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış standart solusyonlarından 100 µl alındı ve 900 µl tampon solusyonu ilave edildi.

- K r için hazırlanmış tüpe 100  l k r solusyonu alındı ve 900  l tampon solusyonu ilave edildi.
- Örnekler için hazırlanmış tüplerin herbirine 100  l örnek alındı ve 900  l tampon solusyonu ilave edildi.
- K r, standart ve örnek tüplerinin herbirine 50  l R1 ayıracından eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı.
- K r, standart ve örnek tüplerinin herbirine 50  l R2 ayıracından ilave edilerek karanlık ortamda 25  C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Örnekler küvetlere aktarıldı ve absorbsanları 400 nm'de spektrofotometrede okundu.
- Örneklerin okunan absorbsan değerleri kitte verilen formül kullanılarak ve dilüsyon oranları göz önünde bulundurulularak hesaplandı.

2.7. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE jel sisteminde akrilamid monomerlerinden yararlanılır. Amonyum persülfat (APS) gibi bir serbest radikal ile TEMED gibi stabilizatörü sağlayıcı ortamda akrilamid monomerleri uzun zincirler oluşturacak şekilde polimerleşmekte ve daha sonra oluşan bu uzun zincirler arasında yanal bağlantılar oluşarak jel meydana gelmektedir. SDS-PAGE analizinde jelin yapısında yer alan sodyum dodesilsülfat (SDS) deterjanın bulunması ile proteinler kendilerini oluşturan monomer alt birimlerine ayrılmaktadır. Böylece protein agregasyonu önlenmektedir. SDS moleküllerine bağlanan denatüre polipeptidler negatif yük kazanırlar. SDS bağlantılı polipeptid kompleksleri, molekül ağırlıklarına bağlı olarak jel içerisinde hareket ederler. Hareket eden moleküllerin ağırlıkları; aynı jel üzerinde bulunan bir standartla karşılaştırılarak tespit edilir. Mutasyon geçirmiş veya çeşitli olumsuz  evre faktörleri sonucunda canlı organizmanın bir kısım proteinlerinden normale göre parça kopması veya parça ilavesi yada bazı proteinlerin yeterince sentezlenmemesi gibi özellikler bu jel sisteminde tespit edilmeye çalışılır.

Protein moleküllerinin hareketi g   kaynağından gelen elektrik akımına göre negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutuba doğru olur. İncelenecek protein molekülleri şayet 0-43 kDa aralığına tekabül ediyorsa akrilamidin konsantrasyonu %15, 40 kDa'dan yukarı ise akrilamidin konsantrasyonu %10 veya daha aşağı düşürülür. Diğer bir ifade ile molekülün ağırlığı arttıkça akrilamidin konsantrasyonu düşürülür. Akrilamid konsantrasyonunun artışı jel içerisindeki ara boşlukların daha sık olmasına sebep olmaktadır. Dolayısıyla protein moleküllerinin hareket hızı da azalmaktadır [180].

Kullanılan çözeltiler

- 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8.)
- 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8.)
- % 10 Sodyum dodesilsülfat çözeltisi (SDS)
- %30 Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi
- %10 Amonyum persülfat çözeltisi (APS)
- N, N, N', N', -tetrametil-etilendiamin (TEMED)
- Gliserin
- 2-β-merkapttoethanol
- %0,05 Bromofenol blue çözeltisi
- Boyama çözeltisi (Stain solusyon/100 ml):

%0.1 Coomassie blue R-250

%45 Metanol

%10 Glasiyal asetik asit

%45 Distile su

- Boya çıkarma çözeltisi (Destain solusyon/100ml):

%45 Metanol

%10 Glasiyal asetik asit

%45 Distile su

- Tank solusyonu (Running buffer, pH 8.3):

Tris base 9.0 gr.

Glisin 43.0 gr.

Distile su 600 ml.

SDS-PAGE için jellerin hazırlanması

Separating (ayırma) jelinin hazırlanması (%12)	Miktar
Distile su	3,35 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml
% 10 SDS	100 µl
Akrilamid /Bis (%30)	4.0 ml
Amonyum persülfat (%10)	50 µl
TEMED	5 µl
Toplam	10.0 ml.

Stacking jelin hazırlanması (%4)	Miktar
Distile su	6.1 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml.
SDS (%10)	100 µl
Akrilamid-Bis (%30)	1.3 ml
Amonyum persülfat (%10)	50 µl
TEMED	10 µl
Toplam	10.0 ml

Örnek solusyonların hazırlanması	Miktar	Son konsantrasyon
1 M Tris-HCl (pH6.8)	1.25 ml	0.125 M
% 10 SDS	1.6 ml	%4
%0.05 bromofenol blue	0.2 ml	%0.002
Gliserol	0.8 ml	% 20
2-β-merkaptioethanol	0.4 ml	%10
Distile su	3.75 ml	-
Toplam	8.0 ml	-

2.7.1. Hipokampus ve Korteks Örneklerinin SDS-PAGE ile Analizi

Serbest ve serbest olmayan protein örnekleri Laemmli tarafından belirtildiği şekilde hazırlanan SDS-PAGE ile incelendi [180].

Jel oluşturmak için uygun bir pozisyonda tutturulan iki cam arasına yerleştirilmek üzere 10 ml' lik separating jel solusyonu hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla belirli kısımlardan sıkıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı. İki cam levha arasına jel ilave edilirken üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar (≈1cm) bir boşluk bırakıldı. Hazırlanan kaset şeklindeki bu iki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra iki cam levhanın üst kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi.

Tarak dişlerinin aradolgu maddesi olarak ifade edilen stacking jel 10 ml kadar hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla, jel kasetine yerleştirilmiş olan tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. Bu dolgu iki camın en üst seviyesine kadar tamamlandı. Stacking jel çok çabuk polimerize olduğundan işlemlerin kısa sürede yapılmasına dikkat edildi. 25-30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme

sağlandı. Tarak, polimerleşmesi tamamlanan jelden çıkarıldı. Bu işlem sırasında jel de meydana gelen ve örneklerin bırakılacağı yuvaların bozulmamasına dikkat edildi. Cam levhalardan oluşan kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Protein çözücü solusyonu; 0,125 M Tris (pH 6.8), %2'lik SDS, %0.002 oranında Bromofenol mavisi, %20'lik gliserol, %10'luk merkapttoethanol şeklinde hazırlandı. Yaklaşık olarak 150 µl olarak alınan her bir protein örneğine eşit oranda çözücü solusyondan ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tarak dışının genişliğine bağlı olarak, hazırladığımız karışımdan 10-20 µl kadar transfer edildi. Tank içerisine yeterli miktarda tank solusyonu ilave edildi.

Güç kaynağından önce düşük bir voltajla (150 V) akım elektroforeze verildi. 5-10 dakika sonra voltaj değeri yükseltildi (180-200 V). Çıplak gözle izlenilebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektroforez cihazı kapatıldı.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak aradaki jel çıkarıldı. Protein bantlarının görünür hale gelebilmesi için bu jel % 1.25'lik Coomassie blue boya ortamına alındı. Burada en az yarım saat en çok bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

Boya solusyonundan alınan jel boyayı giderici solusyon (destain solusyon) ortamına alındı. Arasına çalkalanarak protein bantlarının dışındaki boya maddesi uzaklaştırıldı. Boya giderici solusyonda 5'er dakika bekletildi ve solusyon döküldü. Jel tekrar boya giderici ortama alındı ve bu işlem 2-3 kez tekrarlandı. Böylece jel üzerinde bulunan protein bantlarının dışındaki boya giderilmiş oldu. Jel üzerinde görünür hale gelen protein bantlarının fotoğrafları bir kamera yardımıyla çekildi.

2.8. Western Blot

Western blot; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, nitroselüloz membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla gösterilmesidir. Blotlama yapılmadan önce çalışılan örneklerdeki proteinler elektriksel ortamda poliakrilamid jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri SDS-PAGE'de gerçekleştirilmektedir [181].

Western blot tekniği, elektroforez işlemi takip eden 4 aşamada gerçekleştirilir. Bunlar; jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son aşamada ise proteinlerin görüntülenme aşamalarıdır [182,183].

Nitroselüloz membrana transfer sırasında jel ile nitroselüloz membran karşı karşıya getirilmekte ve bunlar filtre kağıtları arasına yerleştirilmektedir. Jelin büyüklüğü ile orantılı

olarak belirli bir süre elektrik akımı uygulanıp proteinlerin transferi sağlanmaktadır. Nitroselüloz membranın özgül olmayan proteinlerle bloklanmasında albumin tercih edilmektedir [182].

Spesifik antikorlar olarak monoklonal ya da poliklonal antikorlar kullanılabilir. Monoklonal antikorların kullanımı, yalnızca tek bir epitopa özgül olmaları ve çok güçlü immünokimyasal köprüler oluşturmalarından dolayı avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, monoklonal antikorlar antijene spesifik bir bağlanma gösterir. Ancak, çalışılan proteinler arasında benzer epitop bölgeleri bulunmakta ise çapraz reaksiyonlar sonucunda yalancı pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Poliklonal antikorların kullanılması durumunda aynı nedenden dolayı şekillenen yalancı pozitiflik ihtimalinin daha fazla olduğu bilinmektedir [184].

Western blotta monoklonal antikorların kullanımının en önemli dezavantajı, SDS-PAGE ve blotlama esnasında polipeptid yapılarıdaki epitopların ortadan kaldırılmasıdır. Belirlenmeye çalışılan epitopun ortadan kaldırılması durumunda ise monoklonal antikor-epitop bağlanması şekillenemez. Bu nedenden dolayı monoklonal antikor kullanıldığında, poliklonal antikorla çalışılmasına kıyasla, yalancı negatiflik ihtimali artmaktadır. [182].

Özgül antikorlarda raportör madde olarak genellikle radyoaktif izotoplar veya enzimler kullanılmaktadır. Enzim olarak alkalen fosfataz ve peroksidaz enzimleri tercih edilmektedir. Bu enzimlerin substratları ve kromojen maddeleri birbirinden farklıdır. Son yıllarda enzimle işaretlemede, testin duyarlılığını arttırmak amacıyla peroksidazla işaretleli avidin biyotin sisteminin kullanımı yaygınlaşmıştır. Kullanılan kromojenlerin en önemli özelliği çözünmeyen renkli ürünler oluşturmalarıdır [182,183].

2.8.1. Hipokampus ve Korteks Örneklerinin Western Blot ile Analizi

Hipokampus ve korteks örneklerinin western blot analizi Baydaş ve arkadaşları tarafından uygulanan metoda göre yapıldı [93].

Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama): SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. Nitroselüloz membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran (Schleicher and Schuell, Inc., USA) yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve bunlar filtre kağıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilerek tampon solusyonuyla doyuruldu. Soğutulmuş tampon solusyonuyla doldurulmuş tanka yerleştirilen düzenek için 60 dakika boyunca 150 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin transferi sağlanmış oldu.

Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama): Blotlama işlemi bittikten

sonra petri kutularına alınan nitroselüloz membranlar tampon solusyonla [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.025 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.075 M), NaCl (1.45 M)] çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5 dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, 100 mM NaCl , 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 (pH: 7.2) tamponunda % 1'lik taze sığır serum albumini ile 37 °C'de 90 dakikalık inkübasyonla bloklandı.

Özgül antikorlarla tepkime: Primer antikor olarak poliklonal rabbit anti-rat NCAM antikoruna kullanıldı. NCAM primer antikoruna % 0.05 oranında Tween-20 bulunan tamponda 1:2000 oranında hazırlanarak kullanıldı. Nitroselüloz membranlar NCAM antikoruna ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solusyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar % 0.05 oranında Tween-20 bulunan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünoglobulinle 37 °C'de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solusyonuyla yıkandı.

Bantların görüntülenmesi: Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03-0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solusyonu kullanıldı. DAB'la reaksiyon sonucu nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5-10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB'la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların rölatif yoğunlukları Lab. Works 4.0 (Ultra Violet Products Ltd. Combridy, CD4 1TG UK) software programı kullanılarak analiz edildi.

2.9. İstatistiksel Metod

Gruplar arasındaki farklılıklar çift yönlü varyans analizi kullanılarak hesaplandı. Post-Hoc hesaplaması için de Bonferroni' nin *t*-istatistik analizi kullanıldı. *p* değeri <0,05 olarak kabul edildi. *p* değerinden küçük olan bulgular anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

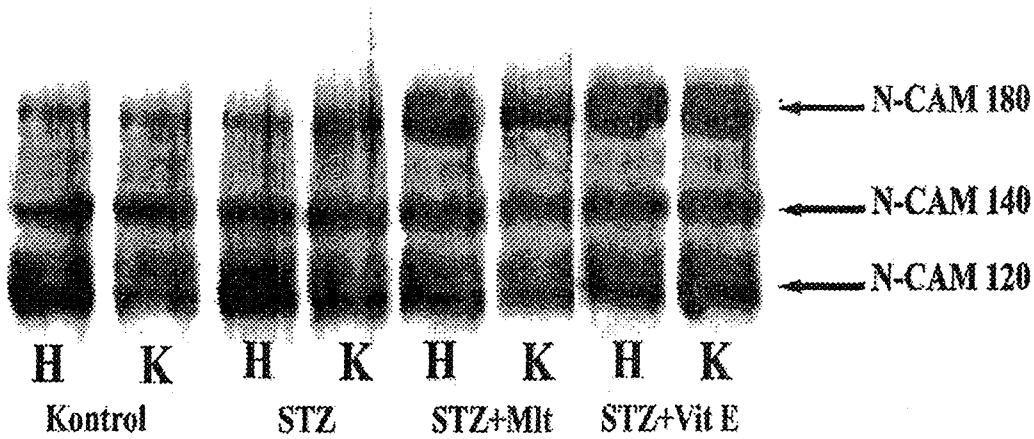
Deneyisel uygulamaların başlangıcında bütün hayvanların kan glukoz seviyeleri ölçülmüş ve glukoz konsantrasyonları tablo 3.1’de verilmiştir. Deneyin sonunda ölçülen glukoz konsantrasyonları kontrol ratlarıyla karşılaştırıldığında STZ uygulanan diyabetik ratlarda önemli ölçüde yükselmiştir. Bu yüksek kan glukoz seviyeleri 7 haftalık deneyisel uygulama süresince melatonin ve vitamin E uygulanan diyabetik ratlarda değişmemiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Kan glukoz düzeyleri (means $\pm$ SEM)

Gruplar	Glukoz (mg/dl)	
	Deney öncesi	Deney sonrası
Kontrol	120 $\pm$ 3.1	124 $\pm$ 3.2
Diyabet	123 $\pm$ 3.2	452 $\pm$ 15.0*
Diyabet+Mel	119 $\pm$ 3.0	437 $\pm$ 14.1*
Diyabet+Vit E	121 $\pm$ 3.1	442 $\pm$ 14.4*

*p < 0.001 kontrole göre anlamlı

Deney gruplarında farklı beyin bölgelerindeki (hipokampus, korteks) NCAM 120, 140, 180 izoformları western blot yöntemiyle analiz edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kontrol, STZ, STZ+Melatonin ve STZ+Vitamin E gruplarında farklı beyin bölgelerindeki NCAM proteinlerinin western blot yöntemiyle analizi.

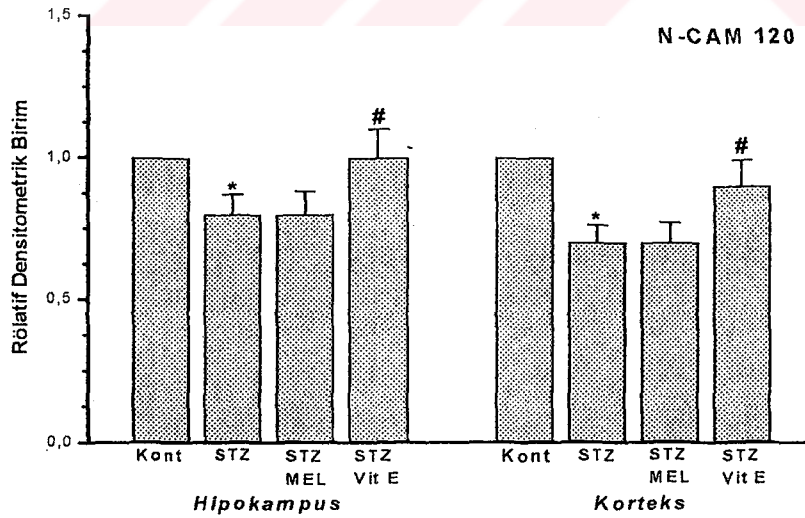
NCAM DÜZEYLERİ

Deney gruplarında farklı beyin bölgelerindeki (hipokampus, korteks) NCAM 120, 140, 180 izoformlarının densitometrik analiz sonuçları tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. NCAM izoformlarının densitometrik analiz sonuçları (means $\pm$ SEM)

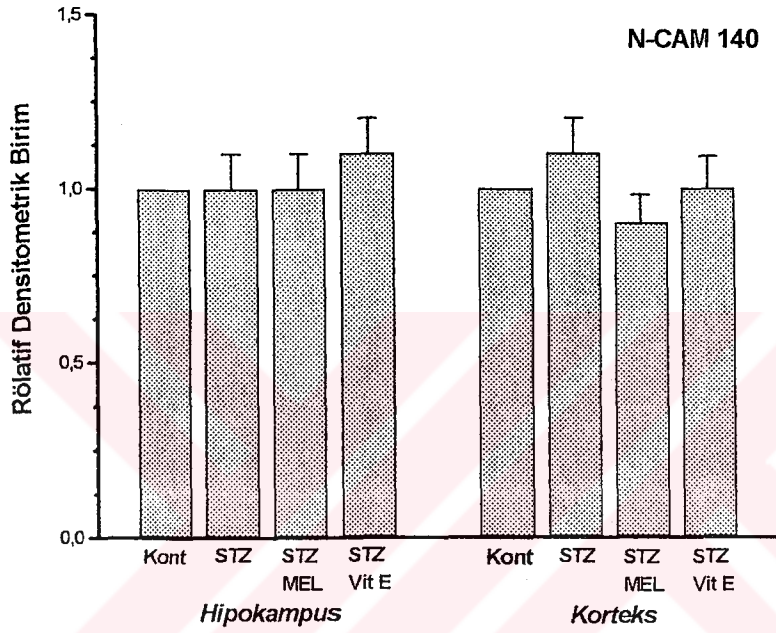
	N-CAM	KONTROL	DİYABET	DİYABET+MEL	DİYABET+VİT E
Hipokampus	180	1.00	2.00 $\pm$ 0.2	8.00 $\pm$ 0.9	8.00 $\pm$ 0.8
Korteks		1.00	3.10 $\pm$ 0.3	4.00 $\pm$ 0.5	7.00 $\pm$ 0.9
Hipokampus	140	1.00	1.00 $\pm$ 0.1	1.00 $\pm$ 0.1	1.10 $\pm$ 0.1
Korteks		1.00	1.10 $\pm$ 0.1	0.90 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.09
Hipokampus	120	1.00	0.80 $\pm$ 0.07	0.80 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.1
Korteks		1.00	0.70 $\pm$ 0.06	0.70 $\pm$ 0.07	0.90 $\pm$ 0.9

Densitometrik analiz sonuçları incelendiğinde; hipokampusta, diyabet grubunda NCAM-120 seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde azaldığı ($p < 0.05$), vitamin E uygulanmış grupta ise diyabet grubuna göre anlamlı bir artış olduğu ($p < 0.05$) tespit edilmiştir. Kortekste, diyabet grubunda NCAM-120 seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde azaldığı ($p < 0.05$), vitamin E uygulanmış grupta ise diyabet grubuna göre anlamlı bir artış olduğu ($p < 0.05$) tespit edilmiştir (Şekil 3.2).



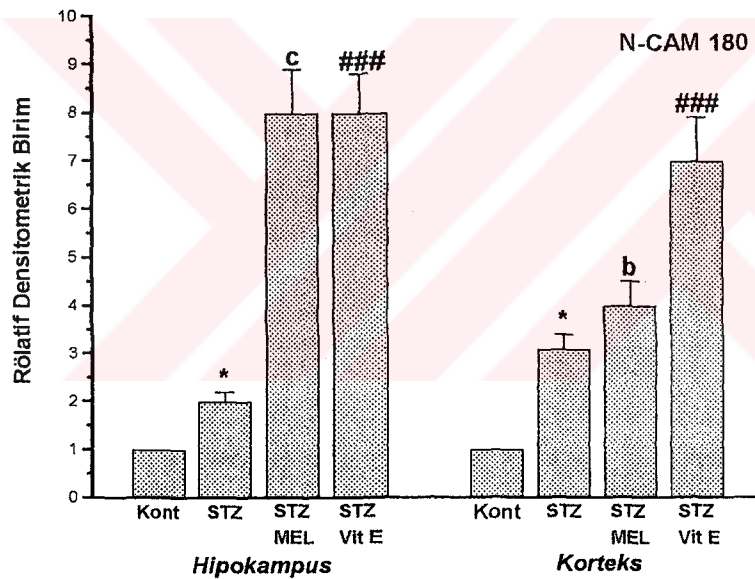
Şekil 3.2. Kontrol, STZ, STZ+Melatonin ve STZ+Vitamin E gruplarında farklı beyin bölgelerindeki NCAM-120 düzeyleri [*p < 0.05 Kontrol grubuna göre; #p < 0.05 STZ grubuna göre anlamlı].

Densitometrik analiz sonuçları incelendiğinde; tüm deney gruplarında, hipokampus ve kortekste NCAM-140 seviyesinin anlamlı bir değişiklik göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Kontrol, STZ, STZ+Melatonin ve STZ+Vitamin E gruplarında farklı beyin bölgelerindeki NCAM-140 düzeyleri.

Densitometrik analiz sonuçları incelendiğinde; hipokampusta, diyabet grubunda NCAM-180 seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde arttığı ($p < 0.05$), melatonin ve vitamin E uygulanmış grupta diyabet grubuna göre oldukça önemli ölçüde bir artış olduğu ($p < 0.001$) tespit edilmiştir. Kortekste, diyabet grubunda NCAM-180 seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı biçimde arttığı ($p < 0.05$), melatonin uygulanmış grupta diyabet grubuna göre önemli bir artış olduğu ($p < 0.01$), vitamin E uygulanmış grupta diyabet grubuna göre oldukça önemli bir artış olduğu ($p < 0.001$) tespit edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Kontrol, STZ, STZ+Melatonin ve STZ+Vitamin E gruplarında farklı beyin bölgelerindeki NCAM-180 düzeyleri [$*p < 0.05$ Kontrol grubuna göre, $^b p < 0.01$ STZ grubuna göre, $^c p < 0.001$ STZ grubuna göre, $^{###} p < 0.001$ STZ grubuna göre anlamlı].

LPO-GSH DÜZEYLERİ

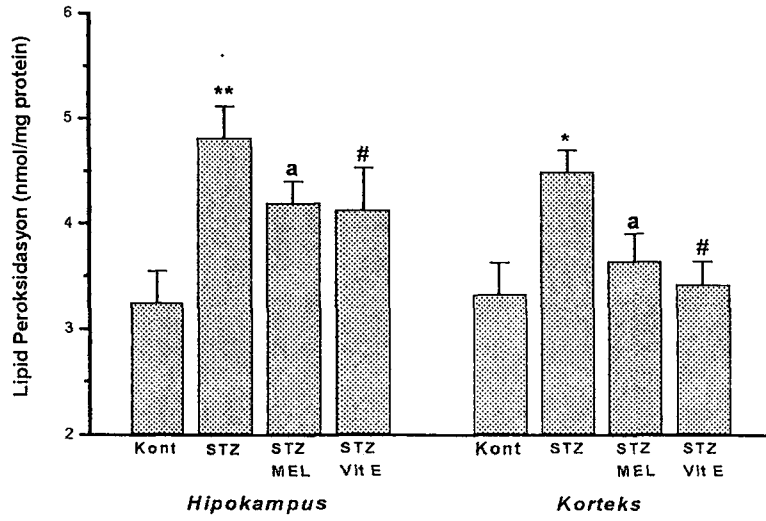
Deney gruplarında farklı beyin bölgelerindeki (hipokampus, korteks) Lipid peroksidasyonu (malondialdehit+4-hidroksialkenal) ve Glutasyon (GSH) seviyeleri ölçülmüş ve sonuçlar tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Faklı beyin bölgelerindeki LPO (MDA+4-HDA) ve GSH düzeyleri (means $\pm$ SEM)

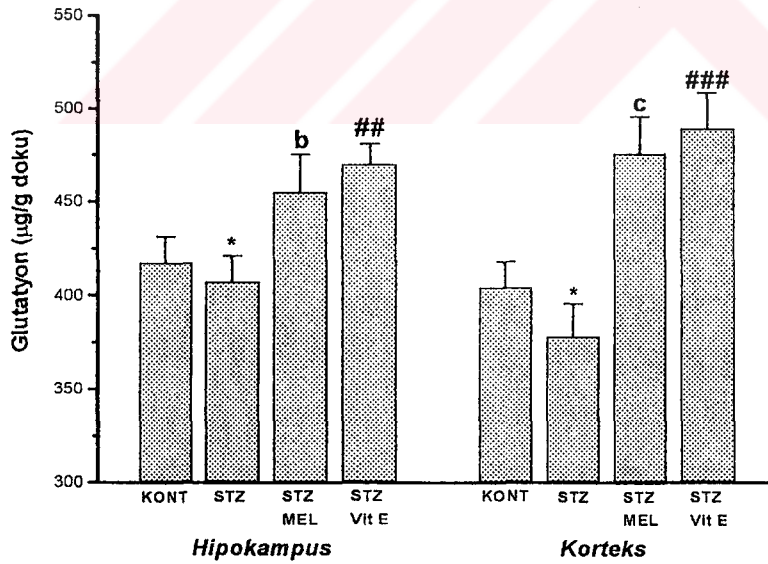
		KONTROL	DİYABET	DİYABET+MEL	DİYABET+VİT E
LPO	Hipokampus	3.25 $\pm$ 0.3	4.82 $\pm$ 0.3	4.20 $\pm$ 0.2	4.13 $\pm$ 0.4
	Korteks	3.33 $\pm$ 0.3	4.50 $\pm$ 0.2	3.64 $\pm$ 0.26	3.42 $\pm$ 0.22
GSH	Hipokampus	417.36 $\pm$ 13.9	407.58 $\pm$ 13.5	455.21 $\pm$ 20.19	470.08 $\pm$ 10.8
	Korteks	404.32 $\pm$ 13.8	378.24 $\pm$ 17.3	475.72 $\pm$ 19.94	489.12 $\pm$ 19.49

Lipid peroksidasyonu (MDA+4-HDA) düzeylerinin; hipokampusta, diyabet grubunda kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı ($p<0.01$), melatonin ve vitamin E uygulanmış gruplarda ise diyabet grubuna göre anlamlı bir azalmanın olduğu ($p<0.05$) tespit edilmiştir. Kortekste, diyabet grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu ($p<0.05$), melatonin ve vitamin E uygulanmış gruplarda ise diyabet grubuna göre anlamlı bir azalmanın olduğu ($p<0.05$) tespit edilmiştir (Şekil 3.5).

Glutasyon (GSH) düzeylerinin; hipokampusta, diyabet grubunda kontrol grubuna göre anlamlı biçimde azaldığı ($p<0.05$), melatonin ve vitamin E uygulanmış gruplarda diyabet grubuna göre önemli ölçüde bir artışın olduğu ($p<0.01$) tespit edilmiştir. Kortekste, diyabet grubunda kontrol grubuna göre anlamlı biçimde azaldığı ($p<0.05$), melatonin ve vitamin E uygulanmış gruplarda diyabet grubuna göre oldukça önemli ölçüde bir artışın olduğu ($p<0.001$) tespit edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.5. Kontrol, STZ, STZ+Melatonin ve STZ+Vitamin E gruplarında farklı beyin bölgelerindeki LPO (Malondialdehit+4-hidroksialkenal) düzeyleri [^{*}p < 0.05, ^{**}p < 0.01 Kontrol grubuna göre anlamlı; ^ap < 0.05 STZ grubuna göre anlamlı, [#]p < 0.05 STZ grubuna göre anlamlı].



Şekil 3.6. Kontrol, STZ, STZ+Melatonin ve STZ+Vitamin E gruplarında farklı beyin bölgelerindeki Glutasyon (GSH) düzeyleri [^{*}p < 0.05 Kontrol grubuna göre, ^bp < 0.01 STZ grubuna göre, ^cp < 0.001 STZ grubuna göre, ^{##}p < 0.01 STZ grubuna göre, ^{###}p < 0.001 STZ grubuna göre anlamlı].

4. TARTIŞMA

Diabetes mellitus yaygın olarak görülen aynı zamanda yapısal ve fonksiyonel şikayetleri de içinde barındıran ciddi bir metabolik hastalıktır. Glukoz metabolizması insülinle bağlantılı eksiklikler yüzünden bozulur. Uzun dönem devam eden diyabet birçok dokuda ciddi hasarlara yol açar. Hiperglisemi ile meydana gelen oksidatif stres diyabetin en sık gözlemlenen komplikasyonlarından biri olan diyabetik nöropatinin gelişmesini sağlar. Reaktif oksijen türleri biyolojik makromoleküllerle etkileşirler [64,97,112].

Beyin vücut ağırlığının sadece küçük bir oranını oluşturmasına rağmen oksijeni oldukça fazla miktarda tüketir. Oksijene yüksek oranda maruz kalması nedeniyle nöral dokular diğer dokulardan daha fazla tahrip olabilmektedirler. Oksijeni yüksek oranda kullanması nedeniyle beyinin ekstra antioksidan kapasiteye sahip olduğu düşünülebilir. Durum böyle olmamakla birlikte beyinin oksidatif tahribe direnç gösterme yeteneği oldukça düşüktür. Beyin merkezi sinir sistemi içerisinde çoğu toksinin girişini sınırlayan kan-beyin bariyerine sahiptir. Fakat bu bariyer aynı zamanda çoğu antioksidanın girişini de sınırlar. Nöronlar tahrip olduğu zaman hasar kalıcıdır. Çünkü bu hücreler farklılaşmışlardır ve artık bölünemezler [141, 153, 163, 164, 179].

Reaktif oksijen türleri lipid ve proteinlerde oksidasyon meydana getirerek membran akışkanlığının azalmasına neden olur. Vitamin E lipidde çözünebilir bir antioksidan olmasından ve hücrel membranların hidrofobik yüzeylerinde yoğunlaşmasından dolayı lipid peroksidasyonunu engelleyici etki gösterir. Vitamin E gibi melatoninde membran akışkanlığını azaltmaya karşı koruyucu yeteneğe sahiptir. Melatonin yüksek oranda lipofilik ve ayrıca hidrofilik olması nedeniyle hücrelere ve hücre üstü kompartmanlara kolaylıkla geçer. Bunun yanı sıra kan-beyin bariyerini de rahatlıkla geçebilmektedir. Çoğu antioksidan bu bariyeri geçemediği için potansiyel nöral bir antioksidan olan melatonin oldukça önemlidir [128, 133, 141].

Oksidatif stres deneysel olarak oluşturulmuş diyabette beyin dokusunda serbest radikal hasarına neden olur. Diyabetin uzun dönem de nörolojik fonksiyon bozukluğuna yol açtığı bilinmektedir. Diyabetle bağlantılı hiperglisemi nedeniyle artan reaktif oksijen ve nitrojen türleri; proteinlerde oksidasyona, tahrip olmuş DNA'ya, hücrel membranlarda lipid peroksit ürünlerinin yoğunlaşmış seviyelerine neden olarak nöron ölümlerinin meydana gelmesine katkıda bulunurlar [186,187]. STZ uygulanan ratlarda günlük olarak uygulanan melatoninin oksijen bazlı reaktanları nötralize ederek dokularda koruyucu etkisinin olduğu açıkça görülmüştür [137,188,189,190].

STZ uygulanarak meydana getirilmiş deneysel diyabet hiperglisemiye sebep olması nedeniyle endojen kronik oksidatif stresin bir örneğini teşkil eder [134,185]. Bu yüzden çalışmamızda ratların farklı beyin bölgelerindeki NCAM proteininin ekspresyonu üzerine STZ ile oluşturulmuş oksidatif stresin etkilerini değerlendirdik ve deneysel diyabet oluşturulmuş ratlarda NCAM ekspresyonuna melatonin ve vitamin E'nin antioksidan etkilerini kontrol ettik.

Çalışmamızda STZ uygulamasının çalışılan beyin bölgelerinde lipid peroksidasyonu (malondialdehit+4-hidroksialkenal) seviyelerini önemli ölçüde yükselttiği bulunmuştur. Bu sonuçlar deneysel diyabette reaktif türlerin üretiminin yükselmesinin refakat ettiği daha önceki çalışmaları teyit eder niteliktedir [137,186]. Deneysel diyabette lipid peroksidasyonunun artmasının bir nedeni potansiyel antioksidan olan glutatyonun seviyelerinin azalmasıdır [191, 192]. Yapılan çalışmaların çoğunda melatoninin oksijen ve nitrojen bazlı reaktanları etkisiz hale getirerek glutatyonun yeniden döngüsünü ve sentezini yükselterek oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir [193,194,195]. Daha önce yapılan çalışmalara uygun olarak yaptığımız çalışmada diyabet gruplarında beyinin hipokampus ve korteks bölgelerinde glutatyon seviyelerinin daha düşük olduğu bulunmuştur. STZ uygulanan ratlarda melatoninin, lipid peroksidasyon ürünlerini azaltırken glutatyon konsantrasyonlarını yükselttiği tespit edilmiştir.

Daha önceki çalışmalarda, serbest oksijen radikallerinin aşırı artmasının ve antioksidanların azalmasının diyabetik komplikasyonlara sebep olduğu, diyabetin beyinde lipid peroksidasyonu düzeyini artırdığı ve potansiyel antioksidan olan glutatyonu azaltarak komplikasyonların gelişimini tetiklediği ayrıca diyabette vitamin E'nin koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir [114,196,197]. Vitamin E'nin nöronlar üzerinde direkt koruyucu etki gösterdiği açıktır. O halde vitamin E'nin etkisi iki yönlüdür. Birincisi lipid peroksidasyonu düzeyini düşürerek membranı koruduğu, ikincisi glutatyon ve glutatyon metabolizmasını sağlayan enzimleri ve bu enzimlerin aktivitelerini artırdığıdır. Bu enzimlerden glutatyon peroksidaz özellikle reaktif oksijen türlerinin tahrip edici etkilerinden beyinin korunmasında önemli bir antioksidatif enzimdir. Çalışmamızda STZ uygulanan ratlarda hipokampus ve korteks homojenatlarında vitamin E'nin lipid peroksidasyon ürünlerini azaltırken glutatyon konsantrasyonlarını artırdığı tespit edilmiştir.

Farklı beyin bölgelerini hipergliseminin neden olduğu nörodejenerasyondan korumak için melatonin ve vitamin E uygulamasından elde ettiğimiz sonuçlar bu antioksidanların önemli ölçüde etkili olduğunu göstermiştir.

NCAM, ergin beyinde sinaptik plastisite ve gelişme esnasında beyin doku organizasyonunu düzenler, aynı zamanda beyindeki tahrip olmuş sinaptik modifikasyonların düzelmesine de yardımcı olur [198,199]. Hipokampus ve kortekste NCAM'ın yüksek düzenleyici etkisinin, diyabetik ratların beyin doku organizasyonunun düzenlenmesinde potansiyel bir role sahip

olabileceğini öne sürer. Bulgularımız NCAM'ın dejenere olmuş dokularda nöral yenilenmenin meydana gelmesine aracılık ettiği yönündeki hipotezi destekler niteliktedir [28,198].

NCAM'ın öğrenme ve hafıza oluşumu esnasında meydana gelen sinaptik değişikliklere aracılık ettiği öne sürülmüştür [63]. Ayrıca diyabetin bilişsel fonksiyonları baskıladığı, öğrenme ve hafıza formasyonunu bozduğu bilinir [100,105,106]. Bu çalışmamızda NCAM-180 ekspresyonu kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında diyabetik ratların hem hipokampusunda hem de korteksinde önemli ölçüde yükselmiştir. NCAM-180, NCAM'ın önemli izoformudur ve NCAM-180 sinaptik bölgelerde hücre bağlantılarının gerçekleşmesinde oldukça büyük bir öneme sahiptir [200].

NCAM-180'nin sitoplazmik bölgesi yardımıyla spektrin ile etkileşimde olduğu bilinir. Bu etkileşimin sinyal iletiminde önemli olduğu öne sürülmüştür [201]. Bu yüzden NCAM-180'nin nöronal bağlantıların yeniden oluşumunda ve sinir sisteminin yenilenmesinde önemli bir role sahip olduğu görülür. Çalışmamızda NCAM-180'nin yükselmesinin hiperglisemiyle uyarıldığı gösterilmiştir. Fakat NCAM ekspresyonunda anormallikleri meydana getiren diyabetin mekanizması hakkında henüz tam olarak bilgi yoktur.

Diyabet NCAM polisializasyonunu engelleyebilmektedir. Ciddi hiperglisemik durumlarda glikozlanan heksozların PSA'nın NCAM ile bağlantı kuracağı aynı aminoasit bölgesine bağlanması ve diyabetlilerde hızlanmış olan NCAM'ın glikasyonu, PSA ve NCAM arasındaki etkileşimi engelleyebilir [202,203]. NCAM üzerinde PSA'nın varlığı sinaptik etkileşimdeki değişikliklere izin verir [204]. Bu yüzden hiperglisemi sinirler arasında sinaptik yeniden modellenmeyi engelleyebilir. Bunlara ilave olarak, diyabetik durumda PSA miktarı düşer [203]. Bu yüzden NCAM-180 seviyeleri ile öğrenme performansı arasında negatif bir ilişki olmasına rağmen NCAM ekspresyonunda dengesizlik ve PSA ekspresyonunda muhtemel değişiklikler veya onlar arasındaki ilişkilerde ortaya çıkan eksiklikler, diabetes mellitusta öğrenme ve hafıza işlemlerinin altında yatan mekanizma olan sinaptik plastisiteyi azaltabilir.

Melatoninin nöronları yüksek oranda koruduğu gösterilmiştir [188,189,205,206]. Melatonin endojen olarak verildiği zaman merkezi sinir sistemine çabucak ulaşır ve burada serumda olduğundan daha yüksek konsantrasyonlara ulaşır [207]. Vitamin E'nin beyin dokusunda meydana gelen serbest radikal reaksiyonlarını etkisizleştirerek serbest radikal hasarının azalmasına neden olduğu bildirilmiştir [172].

Deneyssel diyabette NCAM izoformlarının düzeyleri ilk kez bu çalışmamızda tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular melatonin ve vitamin E'nin antioksidan olarak direkt koruyucu etkisinin yanı sıra nöronların antioksidan kapasitesini artırması yoluyla da nöronları koruyabileceğini göstermektedir. Yine bu antioksidanların STZ uygulanmış ratlarda hipokampus ve kortekste NCAM izoformlarının ekspresyonlarını değiştirdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda farklı beyin bölgelerinde NCAM-120 izoformunun ekspresyonu diyabet oluşturulmuş ratlarda kontrole göre azalmış, NCAM 180 izoformunun ekspresyonu ise diyabet oluşturulmuş ratlarda kontrole göre artış göstermiştir. NCAM-140 izoformunun ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Vitamin E verilmesi diyabet oluşturulmuş ratlarda NCAM-120 izoformunun ekspresyonunu artırmış, yine melatonin ve vitamin E verilmesiyle farklı beyin bölgelerinde NCAM-180 izoformunun ekspresyonu artmıştır. Nöral plastisitede ve nöral doku dejenerasyonunda NCAM ekspresyonunda artışların olduğu bilinmektedir. Bu nedenle NCAM'lar erişkin beyininde öğrenme ve bellek fonksiyonunun görüldüğü hipokampus ve korteks dışında beyin dokusunun organizasyonunun yeniden düzenlenmesinde de rol almaktadırlar. Özellikle aksonal rejenerasyonda önemli rol almalarından dolayı NCAM moleküllerinin beyinin plastisite ve yenilenme gösteren bölgelerinde miktarlarında artış görülür. Hiperglisemik beyinde hipokampus ve kortekste NCAM-180 molekülünün önemli oranda artış göstermesi bu bölgelerde hipergliseminin neden olduğu plastisite ve doku organizasyonundaki bozukluğu onarma yönünde etkili olduğu imajını vermektedir. Nitekim nöral doku koruyucuları olarak bilinen melatonin ve vitamin E verilen gruplarda da NCAM-180 molekülünün yüksek düzeyde bulunması sinir dokusunun plastisite ve yeniden organizasyonunda bu molekülün önemli olduğunu göstermektedir.

5. KAYNAKLAR

1. Cremer, H., Chazal, G., Lledo, PM., Rougon, G., Montaron, MF., Mayo, W., Le, Moal, M., Abrous, DN., 2000, PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity, *J. Devl. Neuroscience*, 18, 213-220.
2. Thomsen, NK., Soroka, V., Jensen, PH., Berezin, V., Kiselyov, VV., Bock, E., 1996, The three-dimensional structure of the first domain of neural cell adhesion molecule, *Nature Structural Biology*, 3, 581-585.
3. Xiao, P., Bahr, BA., Staubli, U., Vanderklish, PW., Lynch, G., 1991, Evidence that matrix recognition contributes to the stabilization but not the induction of LTP, *Neuroreport*, 2, 461-464.
4. Chen, BM., Grinnell, AD., 1997, Kinetics, Ca^{2+} dependence, and biophysical properties of integrin-mediated mechanical modulation of transmitter release from frog motor nerve terminals, *Journal of Neuroscience*, 17, 904-916.
5. Jiang, P., Lagenaur, CF., Narayanan, V., 1999, Integrin-associated protein is a ligand for the p84 neural adhesion molecule, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 559-562.
6. Huang, AM., Wang, HL., Tang, YP., Lee, EH., 1998, Expression of integrin associated protein gene associated with memory formation in rats, *Journal of Neuroscience*, 18, 4305-4313.
7. Yamagata, M., Hermann, JP., Sanes, JR., 1995, Laminin-specific expression of adhesion molecules in developing chick optic tectum, *Journal of Neuroscience*, 15, 4556-4571.
8. Fannon, AM., Colman, DR., 1996, A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins, *Neuron*, 17, 423-434.
9. Takeichi, M., 1995, Morphogenetic roles of classic cadherins, *Current Opinion in Cell Biology*, 7, 619-627.
10. Beesley, PW., Mummery, R., Tibaldi, J., 1995, N-cadherin is a major glycoprotein of isolated rat brain postsynaptic densities, *Journal of Neurochemistry*, 64, 2288-2294.
11. Tang, L., Hung, CP., Schuman, EM., 1998, A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation, *Neuron*, 20, 1165-1175.
12. Benson, DL., Tanaka, H., 1998, N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons, *Journal of Neuroscience*, 18, 6892-6904.

13. Ronn, LCB., Hartz, BP., Bock, E.,: 1998, The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system, *Experimental Gerontology*, 33, 853-864.
14. Cremer, H., Chazal, G., Goridis, C., Represa, A., 1997, NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus, *Molecular Cell Neuroscience*, 8, 323-335.
15. Cremer, H., Chazal, G., Carleton, A., Goridis, C., Vincent, JD., Lledo, PM., 1998, Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95, 13242-13247.
16. Murase, S., Schuman, EM., 1999, The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory, *Current Opinion in Cell Biology*, 11, 549-553.
17. Luthi, A., Mohajeri, H., Schachner, M., Laurent, JP., 1996, Reduction of hippocampal long-term potentiation in transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes, *Journal of Neuroscience Research*, 46, 1-6.
18. Doherty, P., Walsh, FS., 1996, CAM- FGF receptor interactions: a model for axonal growth. *Molecular Cell Neuroscience*, 8, 99-111.
19. Holst, BD., Vanderklish, PW., Krushel, LA., Zhov, W., Langdon , RB. McWhirter, JR., Edelman, GM., Crossin, KL., 1998, Allosteric modulation of AMPA-type glutamate receptors increases activity of the promoter for the neural cell adhesion molecule, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95, 2597-2602.
20. Edelman, GM. And Crossin, KL., 1991. Cell adhesion molecules implications for a molecular histology. *Ann. Rev. Biochem.*, 60, 155- 159.
21. Doyle, E., Nolan, PM., Bell , R., Regan, CM., 1992. Hippocampal NCAM180 transiently increases silylation during the acquisition and consolidation of a passive avoidance response in adult rat, *Journal of Neuroscience Research*, 31, 513-523.
22. Doyle, E., Nolan, PM., Bell, R., Regan, CM., 1992, Intraventricular infusions of anti-neural cell adhesion molecules in a discrete postraining period impair consolidation of a passive avoidance response in the rat, *Journal of Neural Chemistry*, 59, 1570-1573.
23. Chuong, CM., Edelman, GM., 1984. Alterations in neural cell adhesion molecules during development of the nervous system, *Journal of Neuroscience*, 4, 2354- 2368.
24. Gaardsvoll, H., Krog, L., Zhernosekov, D., Andersson, AM., Edvardsen, K., Olsen, M., Bock, E., Linnemann, D., 1993, Age-related changes in expression of neural cell

- adhesion molecule (NCAM) in heart: a comparative study of newborn, adult and aged rats, *European Journal of Cell Biology*, 61, 100-107.
25. Hoffman, S., Grumet, H., Edelman, G.M., 1985, Cell adhesion molecules in the histogenesis of nerve and muscle, In: Ferrans, VJ., Rosenuist, G., Weinstein(eds): *Cardiac Morphogenesis* Elsevier Science Publishers. New York, 36-43.
 26. Wharton, J., Gordon, L., Walsh, F.S., Flanigon , TP., Moore , SE., Polak , JM., 1989, Neural cell adhesion molecule expression during cardiac development in the rat. *Brain Research*, 483, 170- 176.
 27. Poltorak, M., Frye, MA., Wright, R., Hemperly, JJ., George, MS., Pazzaglia, PJ., Jerrels, SA., Post, RM., Freed, WJ., 1996. Increased neural cell adhesion molecule in the CSF of patients with mood disorder, *Journal of Neurochemistry*, 66, 1532- 1538.
 28. Le Gal La Salle, G., Rougon, G., Valin, A., 1992, The embryonic form of neural cell surface molecule (E- NCAM) in the rat hippocampus and its reexpression on glial cells following kainik acid- induced status epilepticus, *Journal of Neuroscience*, 12, 872- 882.
 29. Cotman, CW., Hailer, NP., Pfister, KK., Soltesz, I., Schachner, M., 1998, Cell adhesion molecules in neural plasticity and pathology: similar mechanism, distinct organizations?, *Progress in Neurobiology*, 55, 659-669.
 30. Davis, G.W., Schuster, C.M., Goodman, C.S., 1996, Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. III. CREB is necessary for presynaptic functional plasticity, *Neuron*, 17, 669-679.
 31. Doherty, P., Walsh, F.S., 1994, Signal transduction events underlying neurite outgrowth stimulated by cell adhesion molecules, *Current Opinion in Neurobiology*, 4, 49-55.
 32. Frei, T., von Bohlen und Halbach, F., Wille, W., Schachner, M., 1992, Different extracellular domains of the neural cell adhesion molecule (NCAM) are involved in different functions, *Journal of Cell Biology*, 118, 177-194.
 33. Thiery, J.P., Duband, J.L., Rutishauser, U., Edelman, G.M., 1982, Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 79, 6737-6741.
 34. Maier, C.E., Watanebe, M., Singer, M., McQuarrie, I.G., Sunshine, J., Rutishauser, U., 1986, Expression and function of neural cell adhesion molecule during limb regeneration, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 83, 8395-8399.

35. Martini, R., Schachner, M., 1988, Immunoelectron microscopic localisation of neural cell adhesion molecules (L1, NCAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve, *Journal of Cell Biology*, 106, 1735-1746.
36. Nieke, J., Schachner, M., 1985, Expression of the neural cell adhesion molecules L1 and NCAM and their common carbohydrate epitope L/HNK-1 during development and after transection of mouse static nerve, *Differentiation*, 30, 141-151.
37. Stefano, M.E., Leone, L., Paggi, P., 2001, Polysialylated neural cell adhesion molecule is involved in the neuroplasticity induced by axonal injury in the avian ciliary ganglion, *Neuroscience*, 103, 1093-1104.
38. Tzeng, S.F., Cheng, H., Lee, Y.S., Wu, J.P., Hoffer, B.J., Kuo, J.S., 2001, Expression of neural cell adhesion molecule in spinal cords following a complete transection, *Life Science*, 19, 1005-1012.
39. Dityatev, A., Dityateva, G., Schachner, M., 2000, Synaptic strength as a function of post- versus presynaptic expression of the neural cell adhesion molecule NCAM, *Neuron*, 26, 207-217.
40. Andersson, A.M., Olsen, M., Zhernosekov, D., Gaardsvoll, H., Krog, L., Linnemann, D., Bock, E., 1993, Age-related changes in expression of the neural cell adhesion molecule in skeletal muscle: a comparative study of newborn, adult and aged rats, *Biochemical Journal*, 15, 641-648.
41. Murray, B.A., Hemperly, J.-J., Prediger, E.A., Edelman, G.M., Cunningham, B.A., 1986, Alternatively spliced mRNAs code for different polypeptide chains of the chicken neural cell adhesion molecule (NCAM), *Journal of Cell Biology*, 102, 189-193.
42. Nybroe, O., Albrechtsen, M., Dahlin, J., Linnemann, D., Lyles, J.M., Moller, C.J., Bock, E., 1985, Biosynthesis of the neural cell adhesion molecule: Characterization of polypeptide, *C. J. Cell Biol.*, 101, 2310-2315.
43. Rafuse, V.F., Polo-Parada, L., Landmesser, L.T., 2001, Structural and functional alterations of neuromuscular junctions in NCAM-deficient mice, *Journal of Neuroscience*, 20, 6529-6539.
44. Kiss, J.Z., A role of adhesion molecules in neural plasticity, 1998, *Molecular and cellular Endocrinology*, 140, 89-94.
45. Kiss, J.Z., Troncoso, E., Djebbara, Z., Vutsits, L., Muller, D., 2001, The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair, *Brain Research Reviews*, 36, 175-184.
46. Owens, G.C., Edelman, G.M., Cunningham, B.A., 1987, Organization of the neural cell adhesion molecule (NCAM) Gene: Alternative exon usage as the basis for different

- membrane-associated domains, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 84, 294-298.
47. Sadovl, R., Hirn, M., Degostini-Bazin, H., Rougon, G., Goridi, C., 1983, Adult and embryonic mouse neural adhesion molecules have different binding properties; *Nature*, 304, 347-349.
 48. Small, S.J., Shull, G.E., Santoni, M.J., Akeson, R., 1987, Identification of a cDNA clone that contains the complete coding sequence for a 140-kDa rat NCAM polypeptide, *J. Cell. Biol.*, 105, 2334-2345.
 49. Thompson, J., Dickson, G., Moore, S.E., Gower, H.J., Putt, W., Kenimer, J.G., Barton, C.H., Walsh, F.S., 1989, Alternative splicing of the neural cell adhesion molecule gene generates variant extracellular domain structure in skeletal muscle and brain, *Genes & Development*, 3, 348-357.
 50. Barthels, P., Santoni, M.J., Wille, W., Ruppert, C., Chaix, J.C., Hirsh, M.R., Fontecilla-Camps, J.C., Goridis, C., 1987, Isolation and nucleotide sequence of mouse NCAM cDNA that codes for a Mr 79000 polypeptide without a membrane-spanning region, *Embo Journal*, 6, 907-914.
 51. Jain, S.K., Palmer, M., 1997, The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins, *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 593-596.
 52. Mayford, M., Barzilai, A., Keller, F., Schacher, S., Kandel, E.R., 1992, Modulation of an NCAM-related adhesion molecule with long-term synaptic plasticity in *Aplysia*, *Science*, 256, 638-644.
 53. Hemperly, J.J., Murray, B.A., Edelman, G.M., Cunningham, B.A., 1986, Sequence of a cDNA clone encoding the polysialic acid-rich and cytoplasmic domains of the neural cell adhesion molecule N-CAM, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 83, 3037-3041.
 54. Linnemann, D., Skarsfelt, T., 1994, Regional changes in expression of NCAM, GFAP, and S100 in aging rat brain, *Neurobiology of Aging*, 5, 651-655.
 55. Scholey, A.B., Rose, S.P.R., Zamani, M.R., Bock, E., Schachner, M., 1993, A role for the neural cell adhesion molecule in a late, consolidating phase of glycoprotein synthesis 6 h following passive avoidance training of the young chick, *Neuroscience*, 55, 499-509.
 56. Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., Scheff, S., Baerhels, D., Rajewsky, K., Wille, W., 1994, Inactivation of the NCAM gene in mice result in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning, *Nature*, 367, 455-459.

57. Baydas, G., Reiter, R.J., Nedzvetskii, V.S., Yasar, A., Tuzcu, M., Ozveren, F., Canatan, H., 2003, Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis, *Toxicology Letter*, 137, 169-174.
58. Fields, R.D., Itoh, K., 1996, Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity, *Trends Neuroscience*, 19, 473-480.
59. Brewer, G.J., 2000, Neuronal plasticity and stressor toxicity during aging, *Experimental Gerontology*, 35, 1165-1183.
60. Becker, C.G., Artola, A., Gerardy-Schahn, R., Becker, T., Welzl, H., Schachner, M., 1996, The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation, *Journal of Neuroscience Research*, 45, 143-152.
61. Bailey, C.H., Kandel, E.R., 1993, Structural changes accompanying memory storage, *A. Rev. Physiol.*, 55, 397-426.
62. Crossin, K.L., Krushel, L.A., 2001, Cellular signalling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily, *Developmental Dynamics*, 218, 260-279.
63. Schachner, M., 1997, Neural recognition and synaptic plasticity, *Current Opinion in Cell Biology*, 9, 627-634.
64. Baydas, G., Nedzvetskii, V.S., Nerush, P.A., Kirichenko, S.V., Yoldas, T., 2003, Altered expression of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus, *Life Sciences*, 73, 1907-1916.
65. Sharma, M., Gupta, Y.K., 2001, Effect of chronic treatment of melatonin on learning, memory and oxidative deficiencies induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 70, 325-331.
66. Escames, G., Guerrero, J.M., Reiter, R.J., Garcia, J.J., Munoz-Hoyos, A., Ortiz, G.G., Oh, C.S., 1997, Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates, *Neuroscience Letters*, 230, 147-150.
67. Kiss, J.Z., Rougon, G., 1997, Cell biology of polysialic acid, *Current Opinion Neurobiology*, 7, 640-646.
68. Fukui, K., Onodera, K., Shinkai, T., Suzuki, S., Urano, S., 2001, Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems, *Annals of the New York Academy of Science*, 928, 168-175.

69. Carneiro, RC., Reiter, RJ., 1998, Melatonin protects against lipid peroxidation induced by delta-aminolevulinic acid in rat cerebellum, cortex and hippocampus, *Neuroscience*, 82, 293-299.
70. Krog, L., Olsen, M., Dalseg, AM., Roth, J., Bock, E., 1992, Characterization of soluble neural cell adhesion molecule in rat brain, CSF, and plasma, *Journal of Neurochemistry*, 59, 838-847.
71. Schuster, T., Krug, M., Hassan, H., Schachner, M., 1998, Increase in proportion of hippocampal spine synapses expressing neural cell adhesion molecule NCAM180 following long-term potentiation, *Journal of Neurobiology*, 37, 359-372.
72. O'Connell, AW., Fox, GB., Bary, T., Murphy, KJ., Fichera, G., Foley, AG., Kelly, J., Regan, CM., 1997, Spatial learning activities neural cell adhesion molecule polysialylation in corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe, *Journal of Neurochemistry*, 68, 2538-2546.
73. Fox, GB., O'Connell, AW., Murphy, KJ., Regan, CM., 1995, Memory consolidation induces a transient and time-dependent increase in the frequency of neural cell adhesion molecule polysialylated cells in the adult rat hippocampus, *Journal of Neurochemistry*, 65, 2796-2799.
74. D'hooge, R., De Deyn, P.P., 2001, Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory, *Brain Research Review*, 36, 60-90.
75. Nothias, F., Vernier, P., Von Boxberg, Y., Mirman, S., Vincent, JD., 1997, Modulation of NCAM polysialylation is associated with morphofunctional modifications in the hypothalamo-neurohypophysial system during lactation, *European Journal of Neuroscience*, 9, 1553-1565.
76. McEwen, BS., De Kloet, ER., Rostene, W., 1986, Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system, *Physiological Review*, 66, 1121-1188.
77. Lupien, SJ., McEwen, BS., 1997, The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies, *Brain Research Reviews*, 24, 1-27.
78. Gould, E., McEwen, BS., Tanapat, P., Galea, LAM., Fuchs, E., 1997, Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation, *Journal of Neuroscience*, 17, 2492-2498.
79. Ronn, LCB., Berezin, V., Bock, E., 2000, The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing, *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18, 193-199.

80. Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P., Schachner, M., 1990, The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions, *Journal of Cell Biology*, 110, 193-208.
81. Regan, CM., Fox, GB., 1995, Polysialylation as a regulator of neural plasticity in rodent learning and aging, *Neurochemical Research*, 20, 593-598.
82. Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., Rougon, G., Kiss, JZ., 1996, PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity, *Neuron*, 17, 413-422.
83. Rafuse, VF., Landmesser, L., 1996, Contractile activity regulates isoform expression and polysialylation of NCAM in cultured myotubes: Involvement of Ca^{+2} and protein kinase, *C. J. Cell Biol.*, 132, 969-983.
84. Abrous, DN., Montaron, MF., Petry, KG., Rougon, G., Darnaudery, M., Moal, ML., Mayo, W., 1997, Decrease in highly polysialylated neuronal cell adhesion molecules and in spatial learning during ageing are not correlated, *Brain Research*, 744, 285-292.
85. Ronn, LCB., Bock, E., Linnemann, D., Jahnsen, H., 1995, NCAM-antibodies modulate induction of long-term potentiation in rat hippocampal CA1, *Brain Research*, 677, 145-151.
86. Wieraszko, A., Ball, GF., 1993, Long-term potentiation in the avian hippocampus does not require activation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, *Synapse*, 13(2), 173-178.
87. Guyton, A.C., Hall, J.E., 1996, *Tıbbi Fizyoloji*. 9. baskı. Editör: Çavuşoğlu H., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. Bölüm, 57, 733-734.
88. Taner, D., 1998, *Fonksiyonel Anatomi*, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş. -Metu Press-Yayınları, Ankara, 231-232.
89. Muller, D., Djebbara-Hannas, Z., Jourdain, P., Vutskits, L., Durbec, P., Rougon, G., Kiss, JZ., 2000, Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97, 4315-4320.
90. Guyton, A.C., Hall, J.E., 1996, *Tıbbi Fizyoloji*, 9. baskı. Editör: Çavuşoğlu H., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Bölüm 57, 757-758.
91. Guyton, A.C., 1989, *Tıbbi Fizyoloji*, 7. baskı. Editör: Gökhan, N, Çavuşoğlu, H. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul, Bölüm 54, 935-936.
92. Ganong, W.F., 2002, *Tıbbi Fizyoloji*, Nobel Tıp Kitabevleri, 20. baskı. İstanbul. Bölüm: 16, 259-263.

93. Baydas, G., Nedzvetsky, VS., Nerush, PA., Kirichenko, SV., Demchenko., HM., Reiter, RJ., 2002, A novel role for melatonin: regulation of the expression of cell adhesion molecules in the rat hippocampus and cortex, *Neuroscience Letters*, 326, 109-112.
94. Coyle, JT., Puttfarcken, P., 1993, Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders, *Science*, 262, 689-695.
95. Reiter, RJ., Guerrero, JM., Garcia, JJ., Acuna-Castroviejo D., 1998, Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging, Relation to melatonin, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854, 410-424.
96. Ganong, W.F., 1995, *Tıbbi Fizyoloji*. 16. baskı. Editör : Doğan. A. Barış Kitabevi, İstanbul. Bölüm 19, 365-386.
97. Tuzcu, M., 2000, *Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda Serbest Radikal Reaksiyonlarının Lensdeki Rolü ve Antioksidanlar*, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
98. Baynes, JW., Thorpe, SR., 1999, Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm, *Diabetes*, 48, 1-9.
99. Noyan, A., 1993, *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji*. 8.Baskı. Basım, yayım Meteksan A.Ş. Ankara, S : 421-426 , 1055- 1066.
100. Biessels, GJ., Kappelle, AC., Bravenboer, B., Erkelens, DW., Gispen, WH., 1994, Cerebral function in diabetes mellitus, *Diabetologia*, 37, 643-650.
101. Reaven, GM., Thompson, LW., Nahum, D., Haskins, E., 1990, Relationship between hyperglycemia and cognitive function in older NIDDM patients, *Diabetes Care*, 13, 16-21.
102. Ryan, CM., 1988., Neurobehavioral complications of type I diabetes, Examination of possible risk factors, *Diabetes Care*, 11, 86-93.
103. Tun, P.A., Nathan, D.M., Perlmutter, L.C., 1990, Cognitive and affective disorders in elderly diabetics, *Clinics in Geriatric Medicine*, 6, 731-746.
104. Stewart, R., Liolitsa, D., 1999, Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia, *Diabetic Medicine*, 16, 93-112.
105. Popovic, M., Biessels, G.J., Isaacson, R.L., Gispen, W.H. 2001, Learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats in a novel spatial/object discrimination task, *Behavioural Brain Research*, 122, 201-207.
106. Gispen, W.H., Biessels, G.J., 2000, Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus, *Trends in Neurosciences*, 23, 542-549.
107. Wollf, SP., 1993, Diabetes mellitus and free radicals, *Br Med Bull*, 49, 642-652.

108. Godin, DV., Wohaieb, SA., Garnett, ME., Goumeniouk, AD., 1988, Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 84, 223-231.
109. Marklund, SL., Hagglof, B., 1984, Plasma EC-superoxide dismutase activity in insulin-dependent diabetic children, *Clinica Chimica Acta*, 142, 299-305.
110. Hagglof, B., Marklund, SL., Holmgren, G., 1983, CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin-dependent diabetic children, *Acta Endocrinology*, 102, 235-239.
111. Scribner, KA., Walker, CD., Cascio, CS., Dallman, MF., 1991, Chronic streptozotocin diabetes in rats facilitates the acute stress response without altering pituitary or adrenal responsiveness to secretagogues, *Endocrinology*, 129, 99-108.
112. Scribner, KA., Akana, SF., Walker, CD., Dallman, MF., 1993, Streptozotocin-diabetic rats exhibit facilitated adrenocorticotropin responses to acute stress, but normal sensitivity to feedback by corticosteroids, *Endocrinology*, 133, 2667-2674.
113. Birrell, AM., Heffernan, SJ., Anselin, AD., McLennan, S., Church, DK., Gillin, AG., Yue, DK., 2000, Functional and structural abnormalities in the nerves of type I diabetic baboons: aminoguanidine treatment does not improve nerve function, *Diabetologia*, 43, 110-116.
114. Sima, A.A., Sugimoto, K., 1999, Experimental diabetic neuropathy: an update, *Diabetologia*, 42, 773-788.
115. Packer, L., 1993, The role of anti-oxidative treatment in diabetes mellitus, *Diabetologia*, 36, 1212-1213.
116. Mullarkey, CJ., Edelstein, D., Brownlee, L., 1990, Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173, 932-939.
117. Baynes, JW., 1991, Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes, *Diabetes*, 40, 405-412.
118. Strain, JJ., 1991, Disturbances of micronutrient and antioxidant status in diabetes, *Proc Nutr Soc.*, 50, 591-604.
119. McLennan, SV., Heffernan, S., Wright, L., Rae, C., Fisher, E., Yue, DK., Turtle, JR., 1991, Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes, *Diabetes*, 40, 344-348.
120. Jennings, PB., Chirico, S., Jones, AF., Lunee, J., Barnett, AH., 1987, Vitamin C metabolites and microangiopathy in diabetes mellitus, *Diabetes Research*, 6, 151-154.

121. Young, IS., Torney, JJ., Trimble, ER., 1992, The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat, *Free Radical Biology and Medicine*, 13, 41-46.
122. Velazques, B., Winocour, PH., Kesteven, P., Alberti, KGMM., Lakeer, MF., 1991, Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes, *Diabetic Medicine*, 8, 752-758.
123. MacRury, SM., Gordon, D., Wilson, R., Bradley, H., Gemmell, CG., Paterson, JR., Rumley, AG., MacCuish, AC., 1993, A comparison of different methods of assessing free radical diabetes and peripheral vascular disease, *Diabetic Medicine*, 10, 331-335.
124. Kamal, A., Biessels, GJ., Duis, SE., Gispen, WH., 2000, Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: Interaction of diabetes and ageing, *Diabetologia*, 43, 5000-5006.
125. Biessels, GJ., Kamal, A., Ramakers, GM., Urban, IJ., Spruijt, BM., Erkelens, DW., Gispen, WH., 1996, Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats, *Diabetes*, 45, 1259-1266.
126. Halliwell, B., 1989, Oxidant and the central nervous system: some fundamental questions, *Acta Neurologica Scandinavica*, 126, 23-33.
127. Rouach, H., Ribiere, C., Park, M. K., Saffar, C., Nordmann, R., 1987, Lipid peroxidation and brain mitochondrial damage induced by ethanol, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 18, 211-217.
128. Urano, S., Sato, Y., Otonari, T., Makabe, S., Suzuki, S., Ogata, M., Endo, T., 1998, Aging and oxidative stress in neuradegeneration, *Biofactors*, 103-112.
129. Daniloff, JK., Levi, G., Grumet, M., Rieger, F., Edelman, GM., 1986, Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair, *Journal of Cellular Biology*, 103, 929-945.
130. Stadtman, E., 1992, Free radicals in the genesis of Alzheimer's disease, *Annals of New York Academy of Science*, 695, 73-76.
131. Baydas, G., Nedzvetskii, VS., Tuzcu, M., Yasar, A., Kirichenko, SV., 2003, Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin E, *European Journal of Pharmacology*, 462, 67-71.
132. Baydas, G., Reiter, RJ., Yasar, A., Tuzcu, M., Akdemir, I., Nedzvetskii, VS., 2003, Melatonin reduces glial reactivity in the hippocampus, cortex, and cerebellum of streptozotocin-induced diabetic rats, *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 797-804.

133. Urano, S., Asai, Y., Makabe, S., Matsuo, M., Izumiyama, N., Ohtsubo, K., Endo, T., 1997, Oxidative injury of synapse and alteration of antioxidative defense systems in rats and its prevention by vitamin E, *European Journal of Biochemistry*, 245, 64-70.
134. Low, P.A., Nickander, K.K., Tritschler, H.J., 1997, The role of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy, *Diabetes*, 46, 38-42.
135. Zaltzberg, H., Kanter, Y., Aviram, M., Levy, Y., 1999, Increased plasma oxidizability and decreased erythrocyte and plasma antioxidative capacity in patients with NIDDM, *Israel Medical Association Journal*, 1, 228-231.
136. Greene, D.A., Stevens, M.J., Obrosova, I., Feldman, E.L., 1999, Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy, *European Journal of Pharmacology* 375, 217-223.
137. Baydas, G., Canatan, H., Turkoglu, A., 2002, Comparative analyses of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus, *Journal of Pineal Research*, 32, 225-229.
138. Celik, S., Baydas, G., Yilmaz, O., 2002, Influence of vitamin E on the levels of fatty acids and MDA in some tissues of diabetic rats, *Cell Biochemistry and Function*, 20, 67-71.
139. Linder, R.L., Lerner, S.E., Wesson, D.R., 1974, Solvent sniffing: a continuing problem among youth, *Journal of Drug Education*, 4, 469-473.
140. Klein, D.C., 1993, The mammalian melatonin rhythm-generating system. In: Weterberg L, Ed. *Light and Biological Rhythms in Man*, Neuroscience, Oxford, Pergamon Press, 55-63.
141. Reiter, R.J., 1996, Functional diversity of the pineal hormone melatonin: its role as an antioxidant, *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 104, 10-15.
142. Arendt, J., Skene, D.J., Middleton, B., Lockley, S.W., Deacon, S., 1997, Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work and blindness, *Journal of Biology Rhythms*, 12, 604-612.
143. Argyriou, A., Prast, H., Philippu, A., 1998, Melatonin facilitates short-term memory, *European Journal of Pharmacology*, 349, 159-165.
144. Song, W., Lahiri, D.K., 1997, Melatonin alters the metabolism of the beta-amyloid precursor protein in the neuroendocrine cell line PC12, *Journal of Molecular Neuroscience*, 9(2), 75-92.
145. Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., 1958, Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes, *Journal of the American Chemical Society*, 80, 2587.

146. Reiter, RJ., 1998, Melatonin and human reproduction, *Annals of Medicine*, 30, 103-113.
147. Baydas, G., Ercel, E., Canatan, H., Donder, E., Akyol, A., 2001, Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure, *Cell Biochemistry and Function*, 19, 37-41.
148. Donder, E., Baydas, G., Sokmen, S., Ercel, E., Yalniz, M., Dogan, H., Bahcecioglu, I.H., 1999, Investigation of antioxidant and glucometabolic effects of melatonin in experimental diabetes mellitus, *Biomedical Research*, 10, 127-132.
149. Young, SN., Gauthier, S., Kiely, ME., Lal, S., Brown, GM., 1984, Effect of oral melatonin administration on melatonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, indoleacetic acid, and cyclic nucleotides in human cerebrospinal fluid, *Neuroendocrinology*, 39, 87-95.
150. Fawcett, DW., Jenesh, RP., Pineal gland, In: Bloom, M., Fawcett, DW., Eds., 1977, *Concise Histology*, New York, Chapman & Hall International Thomson Publishing, 164-171.
151. Abe, M., Reiter, RJ., Orhii, PB., Hara, M., Poeggeler, B., 1994, Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in new born rats: evidence for an antioxidative role for melatonin, *Journal of Pineal Research*, 17, 94-99.
152. Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R., Marcheselli, F., 1994, Melatonin: peroxy radical scavenger more effective than vitamin E, *Life Science*, 55, 271-276.
153. Reiter, RJ., 1991, Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interactions, *Endocrinology Review*, 12, 151-160.
154. Cardinali, DP., Golombek, DA., Rosenstein, RE., Cutrera, RA., Esquifino, AI., 1997, Melatonin site and mechanisms of action: single or multiple, *Journal of Pineal Research*, 23, 32.
155. Longoni, B., Salgo, MG., Pryor, WA., Marchiafava, PL., 1998, Effects of melatonin on lipid peroxidation induced by oxygen radicals, *Life Science*, 62, 853.
156. Lee, P., Shiu, SY., Chow, PH., 1995, Regional and diurnal studies of melatonin and melatonin binding sites in the duct gastrointestinal tract, *Biology Signals*, 4, 212.
157. Siu, AW., Reiter, RJ., To, CH., 1998, The efficacy of vitamin E and melatonin as antioxidants against lipid peroxidation in rat retinal homogenates, *Journal of Pineal Research*, 24, 239.
158. Skinner, DC., Malpoux, B., 1999, High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus, *Endocrinology*, 140, 4399.

159. Mallo, C., Zaidan, R., Galy, G., Vermeulen, E., Brun, J., Chazot, G., Claustrat, B., 1990, Pharmacokinetics of melatonin in man after intravenous infusion and bolus injection, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 38, 297.
160. Halliwell, B., Arouma, I., 1991, DNA damage by oxygen-derived species. It's mechanism and measurement in mammalian systems, *FEBS Letter*, 281, 9-19.
161. Ianas, O., Olivescu, R., Badescu, I., 1991, Melatonin involvement in oxidative processes, *Endocrinologie*, 29, 147-153.
162. Baykal, Y., Kocabalkan, F., 2000, Serbest radikaller ve hücre hasarı yapma mekanizmaları, *Sendrom*, 31-38.
163. Reiter, RJ., 1993, Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26, 1141-1155.
164. Reiter, RJ., Leppaluoto, J., 1997, Melatonin as a hormone and an antioxidant: implications for organisms at high latitudes, *International Journal of Circumpolar Health*, 56, 4-11.
165. Tan, DX., Manchester, LC, Reiter, RJ., Cabrera, J., Burkhardt, S., Phillip, T., Gitto, E., Karbownik, M., Li, QD., 2000, Melatonin suppresses autoxidation and hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation in monkey brain homogenate, *Neuroendocrinology Letter*, 21, 361-365.
166. Mayo, JC., Sainz, RM., Uria, H., Antolin, I., Esteban, MM., Rodriguez, C., 1998, Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease, *Journal of Pineal Research*, 24, 179-192.
167. Munoz-Hoyos, A., Sanchez-Forte, M., Molina-Carballo, A., Escames, G., Martin-Medina, E., Reiter, RJ., Molina-Font, JA., Acuna-Castroviejo, D., 1998, Melatonin's role as an anticonvulsant and neuronal protector: experimental and clinical evidence, *Journal of Child Neurology*, 13, 501-509.
168. Ebadi, M., Govitrapong, P., Phansuwan-Pujito, P., Nelson, F., Reiter, RJ., 1998, Pineal opioid receptors and analgesic action of melatonin, *Journal of Pineal Research*, 24, 193-200.
169. Akkuş, İ., 1995, Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Konya, Mimoza yayınları, 85-99.
170. Ünal, D., 1999, Serbest radikaller, *Sendrom*, 11(3), 68-80.
171. Meram, İ., Köylüoğlu, O., Tarakçıoğlu, M., 2001, E vitamini ve klinik önemi, *İbni Sina Tıp Dergisi*, 6, 66-72.

172. Halks-Miller, M., Henderson, M., Eng, L.F., 1986, Alpha tocopherol decreases lipid peroxidation, neuronal necrosis, and reactive gliosis in reaggregate cultures of fetal rat brain, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 45, 471–484.
173. Güven, A., 2001, E vitamini, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dergisi, 3(2), 66-72.
174. Barber, DA., Harris, SR., 1994, Oxygen free radicals and antioxidants: a review, *American Pharmacology*, 34, 26-35.
175. Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Striegl, G., Waeg, G., 1991, Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein, *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 314-321.
176. Baydas, G., Canatan, H., 2001, Comparative analysis of antioxidant effects of melatonin and vitamin E on H₂O₂-generated lipid peroxides in tissue homogenates, *Research Communications Pharmacology and Toxicology*, 6, 287–295.
177. Moosmann, B., Behl, C., 2002, Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders, *Expert Opinion Investigate Drugs*, 11, 1407–1435.
178. Ercel, E., Baydas, G., Akyol, A., Eksioglu, E., Canpolat, L., 1999, The effect of vitamin E on the sciatic nerve lipid peroxidation in streptozotocin induced diabetes mellitus, *Biomedical Research*, 10, 95–101.
179. Reiter, R.J., 1995, Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain, *FASEB Journals*, 9, 526–533.
180. Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680–685.
181. Harlow, E., Lane, D., 1988, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 635-656.
182. Burnette, WN., 1981, "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Analytical Biochemistry*, 112, 195-203.
183. Harlow, E., Lane, D., 1988, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 471-504.
184. Fowler, SJ., 1995, Use of monoclonal antibodies for western blotting with enhanced chemiluminescent detection, In: Davis, WC., (ed). *Monoclonal Antibody Protocols*, Humana Press, New Jersey, 115-127.

185. Sano, T., Umeda, F., Hashimoto, T., Nowata, H., Utsumi, H., 1998, Oxidative stress measurement by in vivo electron spin resonance spectroscopy in rats with streptozotocin-induced diabetes, *Diabetologia*, 41, 1355–1360.
186. Hawkins, C.L., Davies, M.J., 2001, Generation and propagation of radical reactions on proteins, *Biochem. Biophys. Acta*, 1504, 196–219.
187. Luxford, C., Dean, R.T., Davies, M.J., 2000, Radicals derived from histone hydroperoxides damage nucleobases in RNA and DNA, *Chemical Research in Toxicology*, 13, 665–672.
188. Reiter, R.J., 1998, Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin, *Progress in Neurobiology*, 56, 359–384.
189. Reiter, R.J., Acuna-Castroviejo, D., Tan, D.X., Burkhardt, S., 2001, Free radical-mediated molecular damage, Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system, *Annals of the New York Academy of Science*, 939, 200–215.
190. Allegra, M., Reiter, R.J., Tan, D.X., Gentile, C., Tesoriere, L., Livrea, M.A., 2003, The chemistry of melatonin's interaction with reactive species, *Journal of Pineal Research*, 34, 1–10.
191. Tachi, Y., Okuda, Y., Bannai, C., Bannai, S., Shinohara, M., Shimpuku, H., Yamashita, K., Ohura, K., 2001, Hyperglycemia in diabetic rats reduces the glutathione content in the aortic tissue, *Life Science*, 69, 1039–1047.
192. Dincer, Y., Akcay, T., Alademir, Z., Ilkova, H., 2002, Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus, *Metabolism*, 51, 1360–1362.
193. Urata, Y., Honma, S., Goto, S., Iada, T., Cho, S., Honma, K., 1999, Melatonin induces γ -glutamylcysteine synthesis mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells, *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 838–847.
194. Abdel-Wahab, M.H., Abd-Allah, A.R., 2000, Possible protective effect of melatonin and/or desferrioxamine against streptozotocin-induced hyperglycemia in mice, *Pharmacological Research*, 41, 533–537.
195. Reiter, R.J., Tan, D.X., Osuna, C., Gitto, E., 2000, Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress, *Journal of Biomedical Science*, 7, 444–458.
196. Kesavulu, M.M., Giri, R., Rao, B.K., Apparao, C., 2000, Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with micro vascular complications, *Diabetes & Metabolism*, 26, 387–392.

197. Makar, T.K., Nedergaard, M., Preuss, A., Gelbard, A.S., Perumal, A.S., Cooper, A.J., 1994, Vitamin E, ascorbate, glutathione disulphide and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain, *Journal of Neurochemistry*, 62, 45–53.
198. Bastmeyer, M., Schlosshauer, B., Stuermer, C.A., 1990, The spatiotemporal distribution of N-CAM in the retinotectal pathway of adult goldfish detected by the monoclonal antibody D₃, *Development*, 108, 299–311.
199. Bernhardt, R.R., Tongiorgi, E., Anzini, P., Schachner, M., 1996, Increased expression of specific recognition molecules by retinal ganglion cells and by optic pathway glia accompanies the successful regeneration of retinal axons in adult zebrafish, *Journal of Comparative Neurology*, 376, 253–264.
200. Wheal, H.V., Chen, Y., Mitchell, J., Schachner, M., Maerz, W., Wieland, H.D., Van, Rossum, Kirsch, J., 1998, Molecular Mechanisms that underlie structural and functional changes at the postsynaptic membrane during synaptic plasticity, *Progress in Neurobiology*, 55, 611–640.
201. Pollerberg, G.E., BurrIDGE, K., Krebs, K.E., Goodman, S.R., Schachner, M., 1987, The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in a cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions, *Cell and Tissue Research*, 250, 227–236.
202. Kojima, N., Yoshida, Y., Kurosawa, N., Lee, Y.C., Tsuji, S., 1995, Enzymatic activity of a developmentally regulated member of the sialyltransferase family (STX): evidence for α -2-8-sialtransferase activity toward N-linked oligosaccharides, *FEBS Letters*, 360, 1–4.
203. Merry, A.C., Yamamoto, K., Sima, A.A.F., 1998, Imbalances in N-CAM, SAM and polysialic acid may underlie the paranodal ion channel barrier defect in diabetic neuropathy, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 40, 153–160.
204. Tang, J., Rutishauser, U., Landmesser, L., 1994, Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axon in the plexus region, *Neuron*, 13, 405–414.
205. Kapanoglu, E., Palaoglu, S., Demirpence, E., Akbiyik, F., Solarogul, I., Kilinc, A., 2003, Different responsiveness of central nervous system tissues to oxidative conditions and to the antioxidant effect of melatonin, *Journal of Pineal Research*, 34, 32–35.

206. Martin, V., Sainz, R.M., Antolin, I., Mayo, J.C., Herrera, F., Rodriguez, C., 2002, Several antioxidant pathways are involved in astrocyte protection by melatonin, *Journal of Pineal Research*, 33, 204–212.
207. Menendez-Pelaez, A., Poeggeler, B., Reiter, R.J., Barlow-Walden, L., Pablos, M.I., Tan, D.X., 1993, Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence, *Journal of Cell Biochemistry*, 53, 373–382.



ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Adıyaman'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Elazığ'da tamamladıktan sonra 1992 yılında Fırat Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünü kazandım ve 1996 yılında mezun oldum. 1996-1997 yılları arasında Milli Eğitim Bakanlığında öğretmen olarak görev yaptım. 1997 yılında Fırat Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi kadrosuna atandım. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında 1996-2000 yılları arasında yüksek lisansımı tamamladım. 2000 yılında Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimime başladım. Halen Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

