



## FONKSİYONEL PİNEALEKTOMİNİN GENÇ VE YAŞLI RATLARDA KAN, BEYİN VE HİPOKAMPUS LİPİD PEROKSİDASYONU VE ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNE ETKİSİ

Namık DELİBAŞ<sup>1</sup>, Nalan TÜZMEN<sup>2</sup>, İbrahim KILINÇ<sup>1</sup>, İrfan ALTUNTAŞ<sup>1</sup>

### EFFECT OF FUNCTIONAL PINEALECTOMY ON LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN THE BLOOD, BRAIN AND HIPPOCAMPUS OF YOUNG AND OLD RATS.

**Summary:** In this study, the effect of functional pinealectomy on oxidant-antioxidant balance in young and old rats were investigated. Young and old rats were divided into three groups: 1- 12 h light/12 h dark (control group) 2- 24 h light (functional pinealectomy group) 3- 24 h dark (dark group). Finally, there were 6 groups. At the end of a month period, activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and levels of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) in blood, brain and hippocampus samples were determined.

Blood GSH-Px activity was significantly increased and GSH level was low in the old dark group compared to the young dark group. The decrease in GSH-Px and CuZn-SOD activities and increase in the activity of CAT were observed in the control old group respect to the control young group in the brain. Significant increase in the levels of CAT, GSH-Px and CuZn-SOD in the dark young group compared to light young group was found. In hippocampus, CuZn-SOD and Mn-SOD activities and MDA level was significantly higher in control old then those of the control young. In the young dark group, increase in GSH-Px, CuZn-SOD, Mn-SOD and decrease in MDA level was observed with respect to the young light group.

As a result, it was seen that the antioxidant enzyme activities and MDA levels in the blood, brain and especially hippocampus were affected from light-dark treatment. The most significant changes were seen in the dark young group. It was thought that these results are in consistent with antioxidant effects of melatonin.

**Key Words:** Superoxide dismutase, glutathion peroxidase, catalase, malondialdehyde, melatonin..

**Özet:** Bu çalışmada genç ve yaşlı ratlarda fonksiyonel pinealektominin oksidan-antioksidan sisteme etkisi araştırıldı. Bunun için genç ve yaşlı ratlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık (kontrol grubu), 24 saat aydınlık (fonksiyonel pinealektomi grubu) ve 24 saat karanlık (karanlık grubu) olacak şekilde 3'er gruba ayrıldı. Toplam 6 grup oluşturuldu. 4 hafta sonra kan, beyin ve hipokampus örneklerinde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) konsantrasyonları ölçüldü.

Karanlık yaşlı grupta karanlık genç gruba göre kan GSH-Px aktivitesi anlamlı ölçüde yüksek, GSH düzeyi ise düşük bulundu. Beyin dokusunda, kontrol yaşlı grupta kontrol genç gruba göre GSH-Px ve CuZn-SOD enzim aktivitelerinde düşüş, CAT aktivitesinde artış gözlemlendi. Aydınlık genç gruba göre karanlık genç grupta CAT, GSH-Px ve CuZn-SOD aktiviteleri yüksek bulundu. Hipokampüste kontrol yaşlı grupta kontrol genç gruba göre Cu, Zn-SOD ve Mn-SOD aktiviteleri ile MDA seviyelerinde anlamlı artış bulundu. Aydınlık genç gruba göre karanlık genç grupta GSH-Px, CuZn-SOD ve Mn-SOD aktivitelerinde artış, MDA seviyelerinde düşüş gözlemlendi.

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı

<sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Anabilim Dalı

*Sonuç olarak, kan, beyin ve hipokampusde enzim aktiviteleri ile MDA düzeylerinin aydınlık karanlık uygulamasından etkilendiği görüldü. En belirgin değişiklikler karanlık genç grubunda görüldü ve görülen değişikliklerin karanlıkta artan melatoninin antioksidan etkileriyle uyumlu olduğu kanısına varıldı.*

**Anahtar Kelimeler:** Süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz, katalaz, malondialdehit, melatonin.

## GİRİŞ

Oksidatif hasardan vücuttaki tüm organlar arasında en fazla payı, merkezi sinir sistemi alır (1-3). Beyin, vücut ağırlığının oldukça küçük bir yüzdesine (~%2) sahip olmasına rağmen, solunan oksijenin büyük bir miktarını (~ %20) tüketir. O<sub>2</sub>'nin yan ürünleri toksiktir, bu nedenle, sinir dokusunun, diğer organlardan daha hızlı yıkıma uğraması şaşırtıcı değildir. Beyin, önemli antioksidatif enzimleri oldukça düşük seviyelerde içerir<sup>1</sup>. Beyin, oksidatif süreçlerin kolaylıkla başlatılabileceği ve kendi kendine devam edebileceği çoklu-doymamış yağ asitlerini de oldukça yüksek konsantrasyonlarda içerir (3,4). Bu nedenle, serbest radikal aracılı hastalıklara ve erken yaşlanmaya şı koyabilmenin sırrı, organizmaların oksidatif süreçlerin bir sonucu olarak oluşan moleküler bozunmaya karşı koyabilme yeteneklerinde gizlidir (5,6). Melatonin hem serbest radikal toplayıcı hem de antioksidan enzimlerin aktivitesini artırıcı etkisiyle güçlü antioksidan etki gösterir. Kan beyin engelini de rahat geçtiğinden beyinde de antioksidan etki gösterir. Melatonin salınımının gece gündüze göre 5-15 kat daha fazla olduğu bilinmektedir (1). Buna bağlı olarak karanlıkta kalanlarda melatonin salınımının artarak, antioksidan sistemi güçlendirmesi beklenir. Bu çalışmada fonksiyonel pinealektomi uygulaması ile melatonin salınımının baskılandığı veya sürekli karanlık uygulaması ile en yüksek salınımın sağlandığı şartlarda kontrol grubuna göre genç ve yaşlı ratlarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerini araştırdık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### **Deney hayvanlarının gruplandırılması, kan ve doku numunelerinin hazırlanması:**

Bu çalışmada 48 adet Wistar-Albino rat kullanıldı. Ratlar, öncelikle 24 saat karanlık (karanlık grubu), 24

saat aydınlık (fonksiyonel pinealektomi grubu) ve kontrol (12 saat karanlık/12 saat aydınlık) olmak üzere üç gruba bölünüp daha sonra yaşlı ve genç olacak şekilde kendi içlerinde alt gruplara ayrıldılar. Toplam 6 grup oluşturuldu: Grup I:Kontrol genç, Grup II: Kontrol yaşlı, Grup III: Aydınlık genç, Grup IV: Aydınlık yaşlı, Grup V: Karanlık genç, Grup VI: Karanlık yaşlı. Her bir grupta 8 hayvan bulunuyordu. Seçilen ratların hepsi erkek olup genç ratlar 3 aylık, yaşlı ratlar ise 18-24 aylıktı. Fonksiyonel pinealektomi, 24 saat sürekli aydınlık uygulamasıyla oluşturuldu (7). Hayvanlar standart diyet (pellet yem) ile kısıtlama yapılmaksızın beslendi ve bu işlem 4 hafta süreyle uygulandı. Bu süre sonunda ratlar, eter anestezisi altında dekapite edildi. Laparotomi ile renal venden EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Kafatası uygun şekilde kesilerek beyinleri çıkarıldı ve soğuk serum fizyolojik içerisine alınıp derhal buzdolabına konuldu. Beyin doku örneklerinin uygun bir düzenekle hipokampusleri çıkarılıp 50 mM fosfat tamponu (pH=7.8) içerisine alınarak -80oC'da ölçümlere kadar muhafaza edildi. Kan örneklerinden hızlı bir şekilde hemolizat hazırlandı ve hemolizat, ölçümlere kadar -80oC'de muhafaza edildi. Beyin ve hipokampus dokuları, uygun oranlarda 50 mM fosfat tamponu (pH=7.4) ile Ultra Turrax homojenizatör kullanılarak 8000 devir/dk hızında 10 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenizasyondan sonra +4oC'de 1000 g'de 10 dakika süreyle santrifüj edilip süpernatant kısmı ölçümlerde kullanıldı. Bütün deney aşamaları +4oC'de gerçekleştirildi. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma ve Merck'ten temin edilmiştir.

### **Süperoksit dismutaz (SOD) tayini**

Süperoksit dismutaz aktivitesi tayini, kinetik ölçüme dayalı Woolliams ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı (8). Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz



sistemiyle süperoksit radikalının (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) oluşumunu temel almaktadır. Oluşan radikaller, INT [2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür] ile kırmızı renkli formazan oluşturur. SOD aktivitesi, bu reaksiyonunun inhibisyonu ile ölçülür. İnhibe edilmiş reaksiyon hızı, %100 kabul edilip tüm standart ve numunelerin % inhibisyonları aşağıdaki bağıntı ile hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{(\text{DA}_{\text{std}}/\text{num}/\text{min} \times 100)}{\text{DA}_{\text{1}}/\text{min}}$$

#### Mn-SOD tayini

Mn-SOD aktivitesini belirlemek için, 100 mL'lik homojenizat ortamına NaCN (5 mM) ilave edildi. 30 dakikalık inkübasyondan sonra inhibisyon yüzdeleri ölçüldü (9).

#### Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) tayini

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi, Paglia ve Valentine'nin tanımladığı metoda göre ölçüldü (10). Glutasyon peroksidaz, kümen hidroperoksidin glutasyon (GSH) varlığında indirgenmesini katalizler. Kümen hidroperoksidin indirgenmesiyle oluşan glutasyonun yükseltgenmiş formu (GSSG), glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında NADPH'ın NADP<sup>+</sup>'ye yükseltgenmesiyle indirgenir. Enzim aktivitesi, 340 nm'de absorbanstaki değişim izlenerek tayin edilir.

#### Katalaz (CAT) tayini

Katalaz, hidrojen peroksidin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), su ve moleküler oksijen vermek üzere bozunmasını katalizler. Çalışmada, katalaz aktivitesi, kinetik ölçüme dayalı Aebi metoduna göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunda birim zamandaki azalmanın 240 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesiyle ölçüldü (11).

#### Malondialdehit (MDA) tayini

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehit tayini, tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek oluşturduğu renkli kompleksin spektrofotometrik olarak izlenmesine dayanır (12).

#### Glutasyon (GSH) tayini

GSH ölçümü Tietze metodu kullanılarak yapıldı (13). Yöntem GSH'ın Ellman reaktifi (DTNB) ile verdiği renkli ürünün 412 nm'de spektrofotometrik olarak izlenmesine dayanmaktadır.

#### İstatistik

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi bilgisayarda SPSS versiyon 9.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Öncelikle gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı gruplardaki n sayılarının düşük olması ve grupların normal dağılıma uymamasından dolayı ANOVA testinin nonparametrik karşılığı olan Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Daha sonra ikişerli grupların karşılaştırılmasında Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi. p<0.05 anlamlılık düzeyi kabul edildi.

#### BULGULAR

Kan örneklerinde CAT, GSH-Px ve SOD aktivitesi ile GSH ve MDA düzeyleri Tablo 1'de görülmektedir. Aydınlik genç grupta kontrol genç gruba göre SOD anlamlı düşük bulundu. GSH-Px düzeyleri karanlık genç grupta aydınlık genç gruba göre yüksek bulundu. Aynı grupta GSH düzeyi ise düşüktü. MDA karanlık yaşlı grupta kontrol ve aydınlık yaşlı gruptan düşük bulundu.

Beyin dokularında, CAT, GSH-Px ve SOD aktivitesi ile GSH ve MDA düzeyleri Tablo 2'de gösterilmektedir.

Beyin dokusunda GSH tayin edilemedi. Bunun sebebinin GSH konsantrasyonunun sulandırmaya bağlı ölçüm sınırının altına düşmesi olabileceği düşünüldü. Kontrol yaşlılarda gençlere göre CAT yüksek, CuZn-SOD ve GSH-Px düşük bulundu. Aydınlik genç grupta karanlık genç gruba göre GSH-Px aktivitesi düşük bulundu. Karanlık genç ve yaşlı gruplarında GSH-Px aktivitesi diğer gruplara kıyasla oldukça yüksek bulundu. Karanlık genç grupta kontrol genç gruba göre CAT ve GSH-Px aktivitesi yüksek bulundu.

Tablo 1: Eritrosit enzim aktiviteleri ile kan GSH ve MDA düzeyleri

	CAT (k/gHb)	GSH-Px (U/gHb)	SOD (U/gHb)	MDA (nmol/gHb)	GSH (mg/dL)
Grup I	756,60 ± 89,9	634,6 ± 33,4	10351 ± 872 <sup>b</sup>	59,69 ± 9,49	0,9 ± 0,9
Grup II	833,3 ± 179,1	630,7 ± 36,3	10764 ± 36	61,02 ± 7,90 <sup>c</sup>	1,0 ± 0,2
Grup III	620,1 ± 43,65	587,3 ± 40,6 <sup>d</sup>	8766 ± 338	58,24 ± 6,29	1,1 ± 0,2
Grup IV	760,9 ± 129,2	580,3 ± 52,8	9701 ± 1720	63,73 ± 7,15 <sup>e</sup>	1,9 ± 0,2
Grup V	593,7 ± 125,6 <sup>a</sup>	660,0 ± 35,3	10066 ± 903	50,11 ± 7,02	0,8 ± 0,1
Grup VI	833,8 ± 9,6	683,0 ± 35,3	9268 ± 572	41,75 ± 2,49	1,1 ± 0,2

Grup I: Kontrol genç, Grup II: Kontrol yaşlı, Grup III: Aydınlik genç, Grup IV: Aydınlik yaşlı, Grup V: Karanlık genç, Grup VI: Karanlık yaşlı. a: Grup V-VI arasında, p<0.01, b: Grup I-III arasında, p<0.05, c: Grup II-VI arasında, p<0.001, d: Grup III-V arasında, p<0.05, e: Grup IV-VI arasında, p<0.001 (Mann Whitney U testine göre).

Tablo 2: Beyin dokusundaki enzim aktiviteleri ile MDA düzeyleri.

	CAT (k/mg prot)	GSH-Px (U/mg prot)	CuZn-SOD (U/mg prot)	Mn-SOD (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
Grup I	0,01 ± 0,001 <sup>a,d</sup>	0,19 ± 0,03 <sup>a,c,d</sup>	2,24 ± 0,51 <sup>a</sup>	2,20 ± 0,25	26,33 ± 3,20
Grup II	0,05 ± 0,001 <sup>e</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>f</sup>	1,22 ± 0,12 <sup>e,f</sup>	2,19 ± 0,21 <sup>e</sup>	22,63 ± 2,10
Grup III	0,02 ± 0,007 <sup>e</sup>	0,15 ± 0,015 <sup>e</sup>	1,85 ± 0,30 <sup>e</sup>	2,30 ± 0,20	18,56 ± 2,40
Grup IV	0,02 ± 0,002 <sup>h</sup>	0,17 ± 0,018 <sup>h</sup>	2,35 ± 0,33	2,60 ± 0,17	23,13 ± 7,16
Grup V	0,04 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,02 <sup>b</sup>	2,47 ± 0,27	2,41 ± 0,42	32,31 ± 6,04 <sup>b</sup>
Grup VI	0,015 ± 0,001	0,20 ± 0,02	2,30 ± 0,17	2,36 ± 0,17	20,70 ± 3,76

Grup I: Kontrol genç, Grup II: Kontrol yaşlı, Grup III: Aydınlik genç, Grup IV: Aydınlik yaşlı, Grup V: Karanlık genç, Grup VI: Karanlık yaşlı. a: Grup I-II arasında, p<0.001, b: Grup V-VI arasında, p<0.05, c: Grup I-III arasında, p<0.05, d: Grup I-V arasında, p<0.001, e: Grup II-IV arasında, p<0.05, f: Grup II-VI arasında, p<0.001, g: Grup III-V arasında, p<0.05, h: Grup IV-VI arasında, p<0.001 (Mann Whitney U testine göre).

Hipokampus CAT, GSH-Px ve SOD aktivitesi ile GSH ve MDA düzeyleri Tablo 3'de gösterildi.

Hipokampusda GSH ve CAT düzeyleri tayin edilemedi. CAT ve GSH'nın ölçülememesinin homojenizasyon için yapılan sulandırmaya bağlı olabileceği düşünüldü. Karanlık genç grupta kontrol gence göre GSH-Px, Mn-SOD ve CuZn-SOD aktiviteleri artarken, karanlık yaşlı grupta kontrol yaşlı gruba göre CuZn-SOD aktivitesi belirgin arttı. Aydınlik genç gruba göre karanlık genç grupta GSH-Px, CuZn-SOD, Mn-SOD aktiviteleri yükselirken, MDA düzeyleri düştü.

### TARTIŞMA

Vücutta normal veya patolojik olarak serbest radikaller üretilir. Vücutta üretilen bir serbest radikal

olan süperoksit anyonu SOD tarafından hidrojen peroksitide çevrilir. Hidrojen peroksitin kendisi serbest radikal olmadığı halde hidroksil radikali üretimine yol açtığından toksik etki gösterir. Hidrojen peroksitte CAT ve GSH-Px tarafından temizlenir. Bu enzimler enzimatik antioksidan savunma sistemini oluştururlar. GSH enzimatik olmayan savunma sistemi elemanlarından olup GSH-Px aktivitesi içinde gereklidir. Antioksidan savunma sistemi üretilen serbest radikalleri

temizlemekte yetersiz kaldığı zaman serbest radikallerin hücre komponentlerine saldırmasıyla hasar ve sonuçta hücre ölümlü meydana gelir. Serbest radikallerinin hücre zarlarındaki yağ asitleri ile reaksiyona girerek sonuçta zar bütünlüğünün bozulmasıyla sonuçlanan reaksiyon dizisine lipid peroksidasyonu denir. Lipid peroksidasyonu son ürünlerinden MDA konsantrasyonu, oksidatif hasar belirtici olarak kullanılmaktadır (4). Pineal bez hormonu olan melatonin, güçlü bir antioksidandır. Melatoninin yalnız serbest radikalleri toplayarak etki etmediği aynı zamanda, GSH-Px ve SOD enzimlerinin aktivitesini artırdığı hatta SOD'nin ifadesini de artırdığı bildirilmiştir (14). Melatonin hem suda ve hem de yağda çözünme özelliğinden dolayı bütün hücre bölümlerine rahatça geçmektedir. Ayrıca melatonin kan-beyin engelini de geçtiği için beyinde de etkisini göstermektedir. Melatoninin en belirgin özelliklerinden birisi salgılanmasının gün içinde değişim göstermesidir. Melatonin gece, gündüze göre 5-15 kat fazla salgılanmaktadır (1). Bu çalışmada hayvanlar sürekli karanlıkta tutularak en yüksek melatonin düzeyleri, sürekli aydınlıkta tutularak ta en düşük melatonin düzeyleri elde edilmesi planlandı. Sürekli aydınlık uygulamasıyla pineal bezden melatonin salınımının baskılanması fonksiyonel pinealektomi olarak tanımlanmıştır (7).



Tablo 3: Hipokampus enzim aktiviteleri ile MDA düzeyleri.

	GSH-Px (U/mg prot)	CuZn-SOD (U/mg prot)	Mn SOD (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
Grup I	0,16 ± 0,09 <sup>c</sup>	12,23 ± 1,05 <sup>a,c</sup>	6,10 ± 1,57 <sup>a,c</sup>	58,76 ± 14,64 <sup>a,c</sup>
Grup II	0,40 ± 0,04	29,16 ± 2,23 <sup>d,e</sup>	13,84 ± 2,05 <sup>d</sup>	93,31 ± 7,31 <sup>d</sup>
Grup III	0,16 ± 0,06 <sup>f</sup>	10,12 ± 1,87 <sup>f</sup>	5,77 ± 0,64 <sup>f</sup>	70,86 ± 9,31 <sup>f</sup>
Grup IV	0,38 ± 0,26	16,31 ± 1,09 <sup>e</sup>	8,30 ± 0,96	69,95 ± 9,98
Grup V	1,21 ± 0,73 <sup>b</sup>	77,87 ± 3,18 <sup>b</sup>	27,38 ± 4,58 <sup>b</sup>	65,85 ± 26,51 <sup>b</sup>
Grup VI	0,19 ± 0,08	58,29 ± 21,89	11,75 ± 3,31	76,39 ± 8,64

Grup I: Kontrol genç, Grup II: Kontrol yaşlı, Grup III: Aydınlik genç, Grup IV: Aydınlik yaşlı, Grup V: Karanlık genç, Grup VI: Karanlık yaşlı. a: Grup I-II arasında, p<0.01, b: Grup V-VI arasında, p<0.01, c: Grup I-V arasında, p<0.01, d: Grup II-IV arasında, p<0.05, e: Grup II-VI arasında, p<0.001, f: Grup III-V arasında, p<0.01, g: Grup IV-VI arasında, p<0.001 (Mann Whitney U testine göre).

### Kan

Karanlık yaşlı grupta kontrol yaşlı gruba ve aydınlık yaşlı gruba göre MDA düzeyleri anlamlı derecede düşük bulundu. Bu sonuçlar karanlık grupta artması beklenen melatonin etkinliğini yansıtmaktadır. Melatonin güçlü bir antioksidan olup karanlık grupta lipid peroksidasyonu belirteci olan MDA düzeylerindeki azalma karanlıkta melatonin salgısı artışıyla uyumlu bulunmuştur. Ayrıca melatonin, antioksidan enzim aktivitelerini artırarak dolaylı yoldan ilave antioksidan etki göstermektedir. Aydınlik genç grubunda kontrole göre SOD aktivitesi düşük bulundu. Karanlık genç grupta aydınlık genç gruba göre GSH-Px aktivitesi yüksek bulundu. Bu bulgularda melatoninin aktivite artırıcı etkileriyle uyumlu bulundu.

### Beyin

Kontrol genç gruba göre kontrol yaşlı grupta GSH-Px ve CuZn-SOD aktivitelerinde düşüş, CAT aktivitesinde artış gözlemlendi. Karanlık genç gruba göre karanlık yaşlı grupta ise CAT, GSH-Px ve MDA düzeyleri anlamlı düşük bulundu. Kontrol grubunda görülene benzer şekilde GSH-Px ve anlamlı olmasa da CuZn-SOD aktivitesi karanlık yaşlı grupta da düşük bulundu. Ancak kontrolün aksine karanlık yaşlı grupta CAT aktivitesi de düşük bulundu. Bunun genç grupta daha etkin olarak salınan melatonin etkisiyle daha fazla artmış CAT aktivitesinin yaşlılarda olmamasına bağlı olabileceği düşünüldü. Yaşlılarda

melatonin salınımının azaldığı bildirilmiştir (15). MDA düşüklüğü de melatonin etkisini destekledi.

Kontrol genç gruba göre aydınlık genç grupta GSH-Px aktivitesi düşük, karanlık genç grupta ise CAT ve GSH-Px yüksek bulundu. Kontrol yaşlı gruba göre aydınlık yaşlı grupta CAT aktivitesi düşük, karanlık yaşlı grupta ise GSH-Px ve CuZn-SOD aktiviteleri yüksek bulundu. Aydınlik genç gruba göre karanlık genç grupta CAT, GSH-Px ve CuZn-SOD aktiviteleri belirgin derecede yüksek bulundu. Bu bulgu oldukça çarpıcı idi çünkü bu bulgu en düşük melatonin etkisine sahip aydınlık grubu ile en yüksek melatonin etkisine sahip karanlık grubun karşılaştırılmasını göstermekteydi. Karanlık grupta enzim aktivitelerinde belirgin artış görüldü. Bu da melatonin etkisiyle beklenen bir durum olarak yorumlandı.

### Hipokampus

Kontrol genç gruba göre kontrol yaşlı grupta CuZn-SOD ve Mn-SOD aktiviteleri ile MDA seviyelerinde anlamlı artış bulundu. Karanlık yaşlı grupta ise karanlık genç gruba göre GSH-Px, CuZn-SOD, Mn-SOD aktivitelerinde düşme ve MDA seviyelerinde artış bulundu. Aydınlik genç ve yaşlı gruplarında ise hiçbir parametre açısından anlamlı değişimler gözlenmedi. MDA düzeyleri kontrol ve karanlık yaşlı gruplarda benzer şekilde gençlere göre yüksek çıkarken, karanlık grupta kontrol grubun aksine enzim aktivitelerinde düşme görüldü. Bu düşüş karanlık genç gruba göre olup kontrol genç grupla karşılaştırıldığı zaman aslında bir artış olduğu görülmektedir. Bu sonuç melatonin modülasyonunun gençlerde daha dinamik olduğunu düşündürdü. Bu görüşü destekleyen diğer bir bulgu karanlık genç grupta kontrol genç gruba göre GSH-Px, CuZn-SOD ve Mn-SOD aktivitelerinde anlamlı artış görülmesiydi. Aydınlik yaşlı grupta CuZn-SOD ve Mn-SOD aktivitelerinin kontrol yaşlı gruba göre düşük çıkması, yaşlılıkta melatonin düzeylerinin düşük olmasıyla açıklanabilir.

Aydınlık karanlık uygulamasının etkisini gösteren diğer bir çarpıcı bulgu da aydınlık genç gruba göre karanlık genç grupta GSH-Px, CuZn-SOD, Mn-SOD aktivitelerinde belirgin artış MDA düzeyinde ise belirgin düşüş olmasıdır. Karanlık yaşlı grupta da aydınlık yaşlı gruba göre CuZn-SOD aktivitesinde belirgin artış bulundu. Hipokampüsteki bu değişiklikler karanlıkta antioksidan enzim aktivitelerinin arttığını ve lipid peroksidasyonunun azaldığını desteklemektedir. Gerek enzim aktivitelerindeki artış gerekse MDA düzeylerindeki düşme melatoninin antioksidan etkileri ile uyumludur.

Beyin ve hipokampüste görülen değişimler benzer çalışmaların birçoğuyla uyumlu bulundu (16,17,18). Hipokampüste enzim aktivitelerinde önemli değişimler bulundu. Beyin ve özellikle hipokampus bölgesinde enzim aktiviteleri ile MDA düzeylerinde gözlenen değişimler merkezi sinir sistemindeki serbest radikal kaynaklı bazı hasarların mekanizmasının aydınlatılmasında yardımcı olabilir. Ayrıca bu durum, öğrenme ve hafıza gibi hipokampus fonksiyonlarını etkileyebilir. Bilindiği gibi öğrenmenin biyokimyasal bir modeli olarak kabul edilen uzun süreli potensiyasyon (LTP) hipokampüste oluşmakta ve değişik aşamalarda süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri etkili olmaktadır. LTP oluşumunda bir glutamat reseptör alt grubu olan NMDA reseptörleri rol oynar. NMDA reseptör aktivasyonu ile postsinaptik sinir hücresine kalsiyum akışı olur ve sonuçta kalsiyum dahil birçok hücrel haberci molekül sentezlenir. Bu haberci moleküller farklı protein kinazları aktive ederler. Örneğin, kalsiyum/kalmodulin-bağımlı protein kinaz II, protein kinaz C ve cAMP-bağımlı protein kinaz. Son çalışmalarda ROS'un da haberci moleküller olarak görev yaptığı ileri sürülmüştür. ROS'ların bir çok protein kinazı aktive ederek LTP düzenlenmesinde rol oynadıkları gösterilmiştir. Bunlardan süperoksit anyonunun hipokampüste LTP oluşumu ve hafıza fonksiyonlarında gerekli olduğu bildirilmiştir (19,20,21). Bu açıdan serbest radikal üretimini artıran veya antioksidan sistemi etkileyen durumların oksidan hasara yol açacağı hesaplanırken

beyin ve özellikle hipokampus fonksiyonlarına olan etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak aydınlık karanlık uygulamasına bağlı oksidan-antioksidan dengede belirgin değişiklikler olmaktadır. En belirgin değişimler ise karanlık genç grubunda olmaktadır. Bu değişiklikler karanlıkta salınımı artan melatonin etkisine bağlanabilir. Melatonin salgı düzenini etkileyen vardiya sistemi, gece mesaisi, yolculuk ve özellikle uzun uçuşlar gibi durumlarda oksidan-antioksidan denge bozuklukları olabileceği göz önüne alınmalıdır.

### KAYNAKLAR

1. Reiter RJ. (1998) Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Progress in Neurobiology*, 56: 359-384.
2. Floyd RA. (1990) Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J*, 4: 2587-2597.
3. Floyd RA. (1999) Antioxidants, oxidative stress and degenerative neurological disorders. *Exp Biol Med*, 222: 236-245.
4. Halliwell B, Chirico S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr*, 57: 715S-725S.
5. Reiter RJ, Pablos M, Agapito TT, Guerrero JM. (1996a) Melatonin in the context of the free radical theory of aging. *Ann NY Acad Sci*, 786: 362-378.
6. Bourg EL. (2001) Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*, 498: 183-186.
7. John TM, Brown MC, Wideman L. (1994) Melatonin replacement nullifies the effect of light-induced functional pinealectomy on nociceptive rhythm in the rat. *Physiol Behav*, 55: 735-9.
8. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. (1983) Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci*, 34: 253-256.
9. Spitz DR, Oberley LW. (1989) An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem*, 179: 8-18.
10. Paglia DE, Valentine WN. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab and Clin Med*, 70: 158-169.



11. Aebi H. (1974) Catalase, In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergemeyer HU). S 673-684 Academic Press. New York.
12. Draper HH, Hadley M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 186: 421-431.
13. Tietze F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem*, 27: 502-522.
14. Antolin I, Rodriguez C, Sanz R. (1996) Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J*, 10: 882-890.
15. Toutou Y, Haus E. (2000) Alterations with aging of the endocrine and neuroendocrine circadian system in humans. *Chronobiol Int*, 17: 369-390.
16. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. (1991) Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin Chem*, 37: 1932-1937.
17. Bourg EL. (2001) Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*, 498: 183-186.
18. Ceballos-Picot I, Triver JM, Nicole A, Sinet PM, Thevenin M. (1992) Age-correlated modification of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem*, 38: 66-70.
19. Klann E. (1998) Cell permeable scavengers of superoxide prevent long-term potentiation in hippocampal area CA1. *J Neurophysiol*, 80: 452-457.
20. Klann E, Thiels E. (1999) Modulation of protein kinases and protein phosphatases by reactive oxygen species: implications for hippocampal synaptic plasticity. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat*, 23: 359-376.
21. Martin SJ, Grimwood JD, Morris RGM. (2000) Synaptic plasticity and memory: An evaluation of the hypothesis. *Ann Rev Neurosci*, 23: 649-711.