

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**PİNEALEKTOMİ YAPILAN SIÇANLARDA MELATONİN HORMONUNUN  
HİPOKAMPUS ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ  
Murat A. KUŞ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ**

**ELAZIĞ  
2011**

## **ONAY SAYFASI**

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ**

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Murat ÖGETÜRK

F.Ü. Tıp Fakültesi

**Anatomi Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ

**Danışman**

**Doktora Sınavı Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ

Prof. Dr. Nihat EKİNCİ

Doç. Dr. Murat ÖGETÜRK

Doç. Dr. Engin ŞAHNA

Yrd. Doç. Dr. Hıdır PEKMEZ

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince akademik açıdan yetiştirmemi sağlayan, tez çalışmalarımda yol gösteren ve tavsiyeleriyle güven veren Danışman Hocam Prof. Dr. Mustafa SARSILMAZ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarıma yardım ve katkılarından dolayı değerli hocalarım Doç. Dr. A. Oya SAĞIROĞLU, Doç. Dr. Murat ÖGETÜRK ve Doç. Dr. Ahmet KAVAKLI'ya teşekkür ederim.

Doktora tezimin deneysel çalışmalarında yardımlarını gördüğüm Doç. Dr. Engin ŞAHNA, Doç. Dr. Nusret AKPOLAT, Doç. Dr. İsmail ZARARSIZ, Yrd. Doç. Dr. Hıdır PEKMEZ, Yrd. Doç. Dr. Evren KÖSE, Yrd. Doç. Dr. Ufuk TAŞ, Yrd. Doç. Dr. Sedat MEYDAN, Uzm. Dr. Hilal IRMAK SAPMAZ ve Uzm. Dr. Tuncay KULOĞLU'na teşekkür ederim.

Ayrıca hem yüksek lisans hem de doktora eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Oğuz Aslan ÖZEN, Prof. Dr. İlter KUŞ ve Doç. Dr. Ahmet SONGUR'a teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

### **PİNEALEKTOMİ YAPILAN SIÇANLARDA MELATONİN HORMONUNUN HİPOKAMPUS ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Deneysel olarak gerçekleştirilen bu çalışmada, pinealektomili ve pinealektomi sonrası melatonin hormonu uygulanmış sıçanlara ait hipokampustaki değişiklikler biyokimyasal ve mikroskopik düzeylerde araştırıldı.

Bu amaçla, ağırlıkları 200–250 gr arasında değişen toplam 21 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan üç eşit gruba ayrıldı. Grup I'deki sıçanlar kontrol (sham) olarak kullanıldı. Grup II'ye ait hayvanlara cerrahi olarak pinealektomi yapıldı. Grup III'deki sıçanlara ise pinealektomi sonrası günlük dozu 1 mg/kg olan melatonin hormonu üç ay boyunca intraperitoneal olarak verildi. Deney süresi sonunda bütün sıçanlar dekapite edilerek öldürüldü ve beyinleri çıkarıldı. Sağ hemisferlerden hipokampus dokusu çıkarıldı ve süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) seviyelerinin belirlenmesi amacıyla kullanıldı. Sol hemisferler ise total olarak parafine gömüldü. Alınan kesitlerde rutin ve immunohistokimyasal boyamalar yapılarak ışık mikroskopik incelemeler gerçekleştirildi.

Pinealektomi sonrası hipokampus SOD ve GSH-Px enzim değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı, MDA düzeylerinin ise yine anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi. Bu gruba ait histolojik incelemelerde ise, hipokampus CA1, CA2 ve CA3 alanlarını içeren piramidal hücre tabakasına ait piknotik hücre sayısının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Pinealektomi sonrası melatonin verilen sıçanlarda ise, hipokampus SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinin yükseldiği, MDA seviyelerinin de azaldığı tespit edildi. Ayrıca,

melatonin verilen sıçanlarda, pinealektomi sonrası hipokampusta görülen piknotik hücre artışının gerilediği gözlendi.

Mikroskopik ve biyokimyasal düzeylerde yapılmış olan bu çalışma sonucunda, sıçanlarda pinealektomiye bağlı olarak hipokampusta meydana gelen oksidatif doku hasarının, histolojik değişikliklerin ve apoptozisin melatonin enjeksiyonu ile önlendiği tespit edildi.

**Anahtar kelimeler:** hipokampus, pinealektomi, melatonin, apoptozis, sıçan.

**ABSTRACT**

**THE EFFEC OF MELATONIN HORMONE ON HIPPOCAMPUS OF  
PINEALECTOMIZED RATS**

In this experiemntal study, hippocampus tissue samples from pinealectomized rats and melatonin applied rats after pinealectomy were researched.

For this purpose, 21 male Wistar-Albino rats weighing about 200-250 gr were divided equally into three groups. Rats in group I were used as control (sham) while rats in group II were pinealectomized. The rats in group III were applied melatonin hormone every day 1mg/kg for three months after pinealectomy.

At the end of the study, animals were decapitated and the whole brain were removed. The hippocampus tissues of the right brain hemispheres were used to determinate activities of superoxide dismutase (SOD), glutathion peroxidase (GSH-Px) and assignment of malondialdehyde (MDA) levels. Left brain hemispheres were stained with routine histological methods and examined under the light microscope. After pinealectomy operation, significantly decreasing was established in the SOD and GSH-Px enzyme activities of hippocampus, compared with the sham-control group. In addition to, MDA levels were significant increases in rats with pinealectomy when compared sham-control group. In the histological evaluation, tissue specimens of this group's hippocampus CA1, CA2 and CA3 areas, a significant increase were detected the number of picnotic cells. In addition to this, increases were observed in the activities of SOD and GSH-Px enzymes and a decrease of MDA levels in pinealectomized rats plus melotonin was observed.

In the histological evolution of hippocampal CA1, CA2, and CA3 areas in brains from pinealectomized rats, significant increases in the number of picnotic cells were detected.

Otherwise it was determined that increase of issue of picnotic cells were regressed after melatonin injections.

The results of this biochemical and light microscopic examination revealed that pinealectomy induced oxidative tissue damage, histological changes and apoptosis were suppressed by melatonin

**Key words:** hippocampus, pinealectomy, melatonin, apoptosis, rat

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>1.1. Hipokampus</b>	1
1.1.1. Anatomisi	1
1.1.2. Prenatal Gelişimi	3
1.1.3. Histolojik Yapısı	3
1.1.4. Hipokampal Yollar	6
1.1.4.1. Afferent Yollar	6
1.1.4.2. Efferent Yollar	6
1.1.4.3. Papez Devresi	7
1.1.5. Fizyolojisi ve Biyokimyası	8
1.1.6. Fonksiyonları	9
1.1.7. Lezyonları	10
<b>1.2. Pineal Bez</b>	12
1.2.1. Anatomisi	12
1.2.2. Prenatal Gelişimi	14
1.2.3. Histolojik Yapısı	15
1.2.3.1. Pinealositler (Esas Hücreler)	15
1.2.3.2. Glia Hücreleri (İnterstisyel Hücreler)	16
1.2.3.3. Stroma Dokusu (Ara Doku)	17
1.2.4. Pineal Bezin Fizyolojisi	17
1.2.5. Melatonin	17
1.2.5.1. Biyosentezi ve Metabolizması	17
1.2.5.2. Melatonin Sekresyonunun Düzenlenmesi	20
1.2.5.3. Melatonin Hormonunun Fonksiyonları	21
1.2.5.4. Melatonin Hormonunun Hipokampus Üzerine Etkisi	23

<b>1.3. Apoptosis</b>	25
1.3.1. Genel Bilgiler	25
1.3.2. Apoptozisin Düzenlenmesi	29
<b>1.4. İmmunohistokimya</b>	30
1.4.1. Genel Bilgiler	30
1.4.2. İmmunohistokimyada Kullanılan Antikorlar	30
1.4.3. İmmunohistokimyasal Boyama Metodları	30
1.4.3.1. İmmunenzimatik Boyama	30
1.4.3.1.1. Direkt Yöntem	30
1.4.3.1.2. İndirekt Yöntem	30
1.4.3.2. İmmunfluoresan Boyama	34
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	35
2.1. Deney Hayvanlarının Bakımı	35
2.2. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar	36
2.3. Biyokimyasal Ölçümler	37
2.4. Histolojik Uygulamalar	39
2.5. İmmunohistokimyasal Boyama	40
2.6. İstatistiksel Analiz	41
<b>3. BULGULAR</b>	42
3.1. Biyokimyasal Bulgular	42
3.2. Histolojik Sonuçlar	45
3.2.1. Işık Mikroskobik Bulgular	45
3.2.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	51
<b>4. TARTIŞMA</b>	56
<b>5. KAYNAKLAR</b>	62

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo No:</b>	<b>Açıklama</b>	<b>Sayfa No:</b>
<b>Tablo 1</b>	Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkihi.	36
<b>Tablo 2</b>	Histolojik takip serileri.	39
<b>Tablo 3</b>	İmmunohistokimyasal boyama prosedürleri.	40
<b>Tablo 4</b>	İmmunohistokimyasal boyanma yoğunluğunun derecesi.	41
<b>Tablo 5</b>	Gruplara ait hipokampus doku örneklerindeki SOD, GSH-Px ve MDA değerleri (n=7).	43
<b>Tablo 6</b>	Gruplara ait hipokampus CA1, CA2 ve CA3 alanlarını içeren piramidal hücre tabakasına ait piknotik hücre sayıları (n=7).	46

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No:	Açıklama	Sayfa No:
Şekil 1	Beynin iç oblik görünüşü.	2
Şekil 2	Koronal kesitte hipokampus'un yapısı.	5
Şekil 3	Papez devresi.	8
Şekil 4	Pineal bez sinirsel innervasyonu	14
Şekil 5	Melatoninin hormonunun biyokimyasal sentezi.	18
Şekil 6	Pinealosit içerisinde gerçekleşen melatonin üretiminin kontrol mekanizması.	19
Şekil 7	Monoklonal Antikoru Yapısı.	31
Şekil 8	İmmüenzim Boyama Metotları.	34
Şekil 9	Deney gruplarına ait MDA değerleri.	43
Şekil 10	Deney gruplarına ait SOD değerleri	44
Şekil 11	Deney gruplarına ait GSH-Px değerleri	44
Şekil 12	Deney gruplarına ait hipokampus CA1 alanında bulunan piknotik hücre sayısı.	46
Şekil 13	Deney gruplarına ait hipokampus CA2 alanında bulunan piknotik hücre sayısı.	47
Şekil 14	Deney gruplarına ait hipokampus CA3 alanında bulunan piknotik hücre sayısı.	47
Şekil 15	Kontrol grubuna ait hipokampus histolojik yapısının normal görünümü. X20	48
Şekil 16	Kontrol sıçanlarına ait hipokampus mikroskopik yapısı.x40	48
Şekil 17	Pinealektomili hayvanlara ait hipokampus'un histolojik yapısı. X20.	49
Şekil 18	Pinealektomi sonrası hipokampus'ta gözlenen piknotik hücreler (ok) izlenmekte. X40	49

<b>Şekil 19</b>	Pinealektomi sonucu hipokampus histolojik yapısında piknotik hücreler (ok) ile birlikte vakuoler dejenerasyonun olduğu (yıldız) gözlenmekte. X40.	50
<b>Şekil 20</b>	Pinealektomi sonrası melatonin uygulanan sıçanlara ait hipokampus yapısı incelendiğinde, piknotik hücrelerin (ok) azaldığı ve doku görünümünün kontrol grubuna benzediği dikkati çekmekte. X20.	50
<b>Şekil 21</b>	Pinealektomi sonrası melatonin enjekte edilen gruba ait hipokampus'ta çok az miktarda piknotik hücreler (ok) gözlenmekte. X40	51
<b>Şekil 22</b>	Kontrol grubuna ait hipokampus yapısında immunohistokimyasal olarak Bax boyanmasının olmadığı gözlenmekte. X20.	52
<b>Şekil 23</b>	Kontrol sıçanlarına ait hipokampus kesitlerinde negatif Bax boyanması görülmekte. X40	53
<b>Şekil 24</b>	Pinealektomi sonrası hipokampus dokusu incelendiğinde, immunohistokimyasal olarak şiddetli derecede Bax boyanmasının (ok) olduğu dikkati çekmekte. X20.	53
<b>Şekil 25</b>	Pinealektomi sonucu hipokampus'ta gözlenen Bax boyanmasının şiddetli derecede olduğu görülmekte. X40.	54
<b>Şekil 26</b>	Pinealektomi sonrası melatonin uygulanan sıçanlara ait hipokampus yapısında immunohistokimyasal olarak Bax boyanma reaksiyonunun negatif olduğu dikkati çekmekte. X20.	54
<b>Şekil 27</b>	Pinealektomi ile birlikte melatonin enjekte edilen gruba ait hipokampus histolojik yapısının görünümü. İmmuohistokimyasal olarak herhangi bir Bax boyanmasının mevcut olmadığı izlenmekte. X40.	55

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>Kısaltma</b>	<b>Açıklama</b>
<b>CA</b>	Cornu Ammonis
<b>GAD</b>	Glutamat Dekarboksilaz
<b>CCK</b>	Kolesistokinin
<b>VIP</b>	Vazoaktif İntestinal Polipeptid
<b>ACTH</b>	Adrenokortikotropik Hormon
<b>TRH</b>	Tractus Retinohypothalamicus
<b>NSC</b>	Nucleus Suprachiasmaticus
<b>NPV</b>	Nucleus Paraventricularis
<b>GSC</b>	Ganglion Cervicale Superius.
<b>NAT</b>	N-asetiltransferaz
<b>HIOMT</b>	Hidroksiindol-O-metiltransferaz
<b>GnRH</b>	Gonadotropin-Releasing Hormon
<b>LH</b>	Luteinizing Hormon
<b>AIF</b>	Apoptozis İndükleyici Faktör
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>SOD</b>	Süperoksit Dismutaz
<b>GSH-Px</b>	Glutatyon Peroksidaz

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Hippocampus

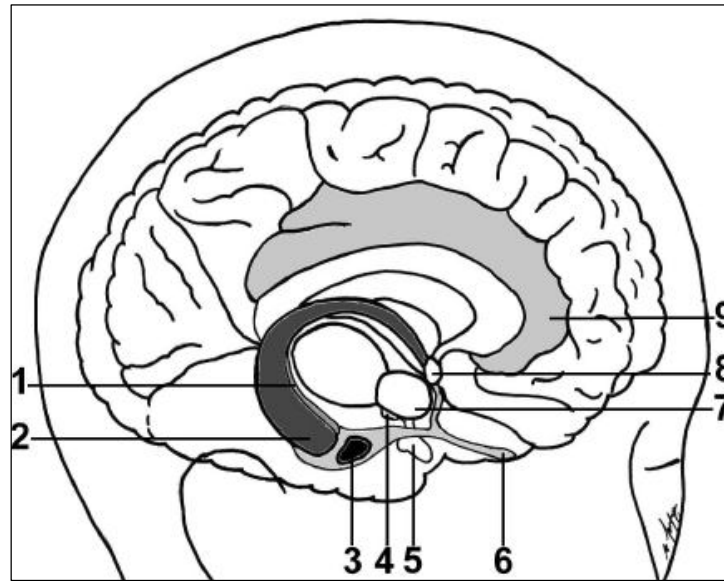
Filogenetik olarak en eski beyin kısımlarından birisi olan hipokampus, insanda lateral ventrikül alt boynuzunun tabanında bulunur. Kesitlerde C harfi şeklinde olan bu yapıya görünümü itibariyle denizatına benzetildiğinden hipokampus adı verilmiştir. Algı ve bellek sistemleri arasında bağlantı kuran hipokampus, beynin birçok bölgesinden duyu lifleri almaktadır. Aldığı bu duyuları, forniks aracılığıyla hipotalamus, talamus ve septal sahaya iletmektedir. Bunun yanı sıra, hipokampus subkortikal alanlarla olan bağlantısı sayesinde, beynin birçok bölgesi ile iletişim halindedir. Öğrenme ve hafıza fonksiyonları üzerinde önemli role sahip olan hipokampus, yeni elde edilen bilgilerin depolanması ve anıların kısa süreli hafızadan uzun süreli hafızaya geçirilmesinde görev alır. Bu nedenle hipokampusta meydana gelebilecek bir hasar, belirtilen fonksiyonlarda bozukluklara neden olabilir. Nitekim hipokampus lezyonlarında, anıların kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe alınmasında sorun olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, verbal veya sembolik anıların hafızada tutulmasının da mümkün olamayacağı ifade edilmiştir (1-6).

### 1.1.1 Anatomisi

Hipokampus, gri cevher tabakasından oluşmuştur ve lateral ventrikülün alt boynuz tabanı boyunca uzanır. Ventriküle bakan yüzü konveks, hemisferin alt kısmına bakan yüzü ise konkavdır. Uzunluğu yaklaşık 5 cm'dir (7). Genişlemiş ön kısmına pes hippocampi adı verilir ve bu bölgede digitationes hippocampi olarak isimlendirilen iki ya da üç adet çıkıntı bulunur. Hipokampus'un konveks olan ventriküler yüzeyi kendi hücrelerinden gelen aksonların oluşturduğu alveus ile

örtülüdür. Bu lifler medialde şerit şeklinde birbirine yaklaşarak fimbria hippocampi'yi oluşturur. Fimbria hippocampi'nin arka ucu alveus ile birlikte crus fornicis'i meydana getirir. Ön ucu ise uncus gyri hippocampi'nin beyaz cevherinde sonlanır. Alveus'tan gelip fimbria hippocampi'ye dahil olan lifler, fornix'in başlangıcını oluşturmaktadır (1-3, 7-10) (şekil 1).

Hipokampus, Cornu Ammonis'in baş harflerini temsilen CA olarak da isimlendirilir. CA içerdiği hücre tiplerinden dolayı CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört alana bölünmüştür. CA1 subiculum'a en yakın olan bölgedir. CA3 ise gyrus dentatus'a en yakın olan hipokampus alanıdır (2, 3, 11, 12). Gyrus dentatus'un bir parçası veya hilusu olarak tanımlanan CA4 bölgesi de, CA3 ile gyrus dentatus arasında yerleşmiştir (11).



Şekil 1. Beynin iç oblik görünüşü. 1- gyrus dentatus, 2- hipokampus, 3- corpus amygdaloideum, 4- corpus mamillare, 5- hypophysis, 6- bulbus olfactoris, 7- hypothalamus, 8- commissura anterior, 9- gyrus cinguli (3).

Piramidal hücre boyutlarının en fazla olduğu hipokampus alanı CA3'tür. Bu bölgede bulunan hücrelerin bir başka özelliği de dentat granüler hücrelerden gelen

mossy lifleri'ni (yosunsu lifler) almasıdır. CA2 ise piramidal hücre yoğunluğunun en çok olduğu alandır ve bu kısımda mossy lifleri görülmez. CA2'ye supramamillar bölge ve hypothalamus'tan yoğun lifler gelir. CA1 ise hipokampus'un en karmaşık bölgesidir. Boyutları birbirinden farklı piramidal hücrelerin bulunduğu bu alanda, hücrelerin % 10'unu internöronlar meydana getirir (2, 11).

### **1.1.2. Prenatal Gelişimi**

Hipokampus, hemisfer duvarının diencephalon'a bakan bölümünden gelişmektedir. Bu gelişim süreci şu şekilde gerçekleşir. Diencephalon tavanına bitişik olan hemisfer duvarı, üzeri vasküler mezenşimle örtülü tek sıralı ependimal hücrelerden oluşur. Bu iki yapı, yani ependim hücreleri ve vasküler mezenşim birlikte plexus choroideus'u meydana getirir. Plexus choroideus'un hemisfer tavanını oluşturması gerekirken, hemisferin değişik bölümlerinin orantısız olarak büyümeleri yüzünden bu olay gerçekleşmez ve plexus choroideus, fissura choroidea olarak adlandırılan bir çizgiyi takip ederek lateral ventrikül içerisine girer. Hemisfer duvarı, fissura choroidea'nın hemen üzerinde kalınlaşarak hipokampus'u ortaya çıkarır (1, 4, 5, 6).

### **1.1.3. Histolojik Yapısı**

Hipokampus'un mikroskobik yapısı incelendiğinde, ventriküler yüzeyden derine doğru toplam yedi tabakadan meydana geldiği görülür (11) (Şekil 2).

#### *1. Alveus hippocampi*

Hipokampus'a ait piramidal hücre aksonları, afferent ve efferent lifleri içeren tabakadır (2, 3).

## 2. *Stratum oriens*

Piramidal hücrelerin bazal dendritleri ve internöronlar bu katmanda yerleşmiştir. Bu tabakada bulunan hücre aksonlarının çoğu alveus liflerine katılırken, bir kısmı da en derinde yer alan moleküler tabakaya uzanmaktadır. (1, 11).

## 3. *Stratum pyramidale*

Bu katmanda yoğun olarak piramidal ve Golgi Tip II hücreleri bulunmaktadır. Bölgede yerleşmiş olan piramidal hücreler hipokampus'un şeklini ortaya koyar. Bu hücrelerin tabanı hipokampus'un ventriküler yüzeyine doğru dönüktür. Bazı hücrelerin her iki kutbundan çıkan zengin pleksus ağı piramit görünümüne neden olur. Piramidal hücrelere ait aksonlar stratum oriens tabakasını geçerek alveus liflerine katılır. Bu hücrelerin bazal-apikal dendritleri de komşu tabakalara kadar uzanır (2, 13).

Piramidal katmanda, kısa aksonlu hücreler de bulunmaktadır. Sepet hücreleri bu grup hücreler arasında yer alır. Hipokampus'un iç aktivitesini düzenleyen sepet hücreleri stratum oriens ile stratum pyramidale arasındaki geçiş alanında bulunur. Bu hücrelerin aksonları alveus hippocampi'ye uğramadan zıt yönde ilerler ve piramidal hücrelerin çevresinde yoğun bir ağ yapar. Daha sonra stratum radiatum'a geçer (2, 14).

## 4. *Stratum lucidum*

Sadece CA3 alanında bulunan bu tabaka, yosunsu liflerden (mossy lifleri) zengindir. Yosunsu lifler ise piramidal hücreler ile bağlantıyı sağlar (11).

## 5. *Stratum radiatum*

Işımsal dallara sahip olan bu tabaka geniş bir ağ yapısındadır (11).

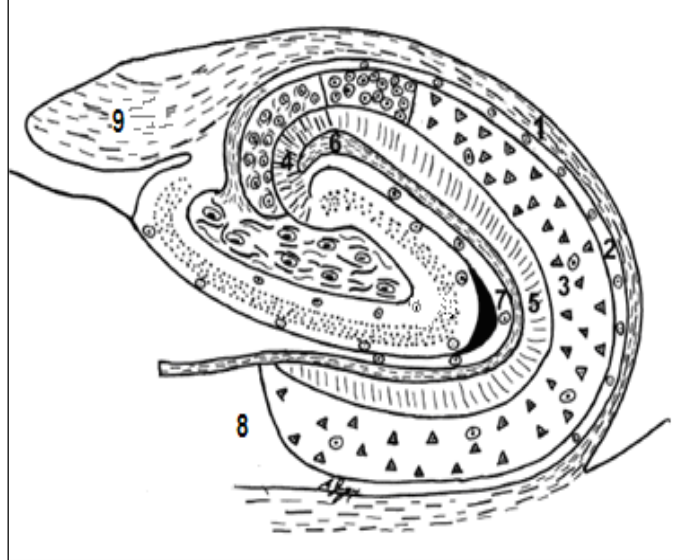
#### 6. *Stratum lacunosum*

Area entorhinalis'ten (Brodmann 28 nolu alan) gelen önemli afferent liflerin sonlandığı tabakadır (11).

#### 7. *Stratum moleculare*

Çok az miktarda nöron ve sinir lifleri içermektedir.

Bunun yanı sıra, hipokampus'un son üç tabakası "stratum moleculare" adı altında tek bir katman olarak da kabul edilmektedir. Bazı kaynaklarda ise son iki tabaka "stratum lacunosum-moleculare" ismiyle ifade edilmektedir (1, 2, 8, 14).



Şekil 2. Koronal kesitte hipokampus'un yapısı. Hipokampus: 1- alveus, 2- stratum oriens, 3- stratum pyramidalis, 4- stratum lucidum, 5- stratum radiatum, 6- stratum lacunosum, 7- stratum moleculare, 8- subiculum, 9- fimbria hippocampi (3)

### 1.1.4. Hipokampal Yollar

#### 1.1.4.1. Afferent Yollar

Hipokampus'un afferent lifleri tüm duyuşsal uyarıları ihtiva eder. Area entorhinalis'ten gelen duyular dört yolla hipokampus'a ulaşmaktadır;

1- Perforant yollar: Entorhinal korteks'ten gelen lifler, subiculum boyunca

gyrus dentatus'a ilerleyerek tüm hipokampus'a dağılır.

2- Yosunsu (mossy) lifler: Gyrus dentatus'tan CA3 alanına gider.

3- Schaffer kollateralleri: Piramidal hücre lifleri olan bu dallar CA3 ve CA2 alanlarından CA1 alanına doğru uzanır.

4- Alvear lifler: Subkortikal alanlardan gelen bu lifler alveus'tan hipokampus'a geçer. Hipokampus'un CA1 alanı ile subiculum'un iç tabakasına dağılır (1, 8, 15-17).

Hipokampus, gyrus parahippocampalis'ten aldığı uyarıları fornix aracılığı ile corpus mamillare, area septalis ve hypothalamus'un bazı çekirdeklerine gönderir (18). Hipokampus, yine fornix aracılığı ile nuclei anteriores thalami, area hypothalamica posterior, corpus mamillare, area septalis, substantia innominata, area tegmentalis ventralis, nuclei raphe ve nucleus parabrachialis'ten lifler almaktadır (1, 19).

#### **1.1.4.2.Efferent Yollar**

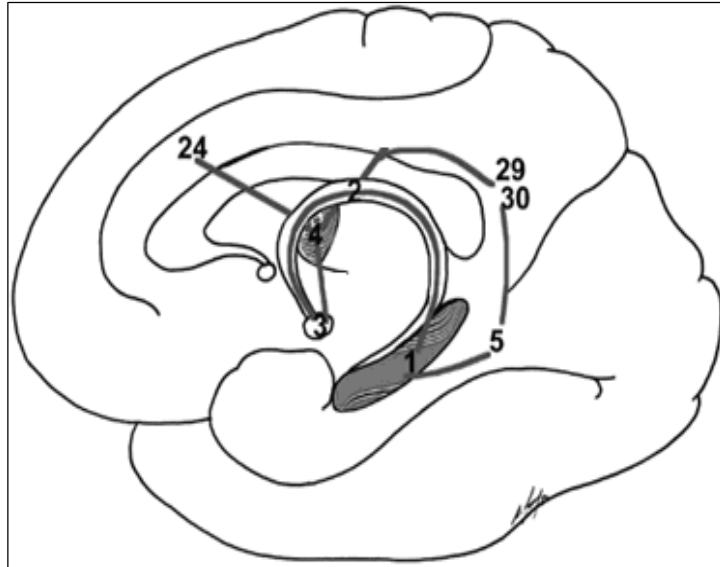
Fornix, hipokampus'un en büyük efferent yoludur. Hipokampus ve subiculum'dan başlayan miyelinli lifler, alveus'tan fimbria hippocampi'ye geçer. Sayıları 1.2-2.7 milyon arasında değişen bu lifler, splenium corporis callosi'nin altında crus fornicis; thalamus'un arkasında ise corpus fornicis olarak devam eder. Her iki crus fornicis arasında çapraz yapan liflere commissura hippocampi adı verilir. Corpus fornicis'ten sonra columna fornicis olarak uzanan aksonlar, foramen interventriculare önünde kavis yaparak nuclei anteriores thalami ve nucleus dorsalis lateralis thalami'ye lifler gönderir. Bu liflere postcomissural lifler adı verilir. Buradan hypothalamus'a uzanan liflerin çoğu corpus mamillare ve nucleus ventromedialis hypothalamica'da sonlanır. Columna fornicis'ten commissura

anterior'a ayrılan az sayıdaki fornix lifleri ise area septalis, substantia innominata ve area hypothalamica rostralis'e geçerler (1, 2, 4, 13).

### 1.1.4.3. Papez Devresi

Hipokampus'un dış bağlantılarını ifade eden Papez Devresi, sırasıyla hipokampus, fornix, corpus mamillare, tractus mamillothalamicus, nuclei anteriores thalami, gyrus cinguli, gyrus parahippocampalis ve hipokampus'a geri bağlantılar yapan nöronları kapsar (2, 18, 20). Bu devre içerisinde, uyarıların ardı ardına birbirlerini izlemesi, yaşadığımız bir duygunun giderek şiddetlenmesine ve iz bırakmasına neden olur. Duygusal tepkilerin olabilmesi için papez devresinin iyi çalışması gereklidir (2, 4, 20) (Şekil 3).

Sağ ve sol hipokampus, komissural yollar aracılığı ile birbirleriyle bağlantı içindedir. Dejenerasyon metoduyla yapılan çalışmalarda, hipokampus'tan neocortex'e doğrudan giden yollar da tespit edilmiştir (2, 3).



Şekil 3. Papez devresi: Hipokampus'tan (1) çıkan lifler sırasıyla fornix (2), corpus mamillare (3), nuclei anteriores thalami (4), gyrus cinguli (Brodmann 24, 29, 30 alanları), gyrus parahippocampalis (5) yolunu izleyerek hipokampus'a geri dönerler (3).

### **1.1.5. Fizyolojisi ve Biyokimyası**

Hipkampus yapısında monoaminerjik, kolinerjik ve GABAerjik afferentler mevcuttur. Dokuda en çok salgılanan eksitatör transmitterler glutamat ve aspartat'tır. Stratum oriens tabakasında, somatostatin-immunoreaktif ve glutamat dekarboksilaz (GAD)-immunoreaktif lifler, stratum lacunosum'da somatostatin-immunoreaktif lifler, stratum pyramidale'de glutamat dekarboksilaz (GAD)-immunoreaktif ve kolesistokinin (CCK)-immunoreaktif lifler, stratum radiatum'da ise glutamat dekarboksilaz (GAD)-immunoreaktif lifler bulunmaktadır. Ayrıca, hipokampus'un çoğu bölgelerinde vazoaktif intestinal polipeptid (VIP) ile CA3 bölgesine giden mossy liflerinde bir opioid peptid olarak bilinen dinorfin yaygın olarak bulunur (2, 11).

### **1.1.6. Fonksiyonları**

Karmaşık yapısı ve beyindeki birçok bölge ile bağlantılarının olması nedeniyle, hipokampus fonksiyonlarının tanımında güçlük çekilmektedir (2, 9, 10, 21, 22). 1948'lere kadar, sadece koku ile ilgili bağlantılarının olduğu düşünülen hipokampus'un (7), koku yollarının gelişmediği kişilerde de normal bir düzeyde gelişimini tamamladığı ortaya konmuştur (2, 8, 11).

İşitme, görme, koku alma, dokunma ve visceral duyular gibi her türlü duyuşal stimuluslar, minimal düzeyde de olsa hipokampus'u aktive etmektedir. Uyarılan hipokampus ise hypothalamus, ventral thalamus ve limbik sistem üyelerine sinyaller göndermektedir. Bu şekilde hipokampus, hareketlerin davranış biçimine dönüşmesinden önce, limbik sistemi etkileyerek davranışların şekillenmesine neden olur (13). Bu yüzden, hipokampus'un gelen duyuşal sinyalleri içerisinden geçiren ek bir kanal rolü oynadığı düşünülmektedir (23).

Hipokampus'un, kısa süreli hafıza (yeni bilgilerin depolanma kapasitesi) ile çok yakın bir ilişkisi vardır (2, 25). Bu yüzden, verbal veya sembolik anıların uzun süreli ve kalıcı olabilmesi için sağ ve sol hipokampus'a gereksinim vardır (2, 8, 13, 23). Ayrıca görsel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda sağ, sözel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda ise sol hipokampus daha fazla aktivite göstermektedir. Bu bölgelerin lezyonlarında da ilgili hafızalarda kayıplar meydana geldiği bildirilmektedir (26, 27).

Hipokampus'un endokrin fonksiyonlar üzerinde de etkili olduğu bildirilmektedir. Hipokampus'un uyarılması sonucu ovulasyonda inhibisyonun meydana geldiği gösterilmiştir. Ayrıca, fornix'in kesilmesine bağlı olarak adrenokortikotropik hormon (ACTH) salınımında düzensizlikler olduğu saptanmıştır (4). Bunun yanı sıra, hipokampus yapısının cortex cerebri üzerinde retiküler aktivitenin ayarlanması, heyecanın kontrolü ve iç organlara ait aktivitenin düzenlenmesi gibi işlevleri de mevcuttur (2, 3).

#### **1.1.7. Lezyonları**

Hipokampus'un uyarılması sonucu epileptik nöbetlerin olduğu bildirilmektedir. Bu nöbetler esnasında kişinin bilinci açıktır ve şahıs gerçek olmadığını bildiği koku, görme, işitme, dokunma ve benzeri tarzda hallüsinasyonlar tanımlamaktadır (23, 28).

Hipokampus'u da içine alacak bir biçimde lobus temporalis medial parçalarının çift taraflı çıkarılmasından sonra hafıza kaybının yanı sıra, Klüver-Bucy Sendromu olarak bilinen klinik tablonun meydana geldiği bildirilmiştir (1-3, 28, 29). Bu sendromda ise aşağıdaki belirtilerin görüldüğü ortaya konmuştur;

1. Canlı ya da cansız ayrımı yapmaksızın değişik tür ve cinsteki nesnelere karşı seksüel aktivitede artış,

2. İlk defa görülen objelere anlam verememe,

3. Yeni şeyleri hafızada tutma zorluğu,
4. Yeni beceriler elde edememe,
5. Korku ve kızgınlık duygularında azalma, uysallık hali,
6. Beslenme alışkanlıklarında değişiklikler (yiyecekleri sürekli ve uzun şekilde kokladıktan sonra yeme ya da değişik cisimlere karşı yeme isteği vs.).

Bunun yanı sıra, şiddetli alkolizm, tiamin eksikliği, kronik malnutrisyon, kanama ve enfarktüs durumlarında hipokampus'ta iki taraflı olarak disfonksiyonlarının ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu lezyonlar sonucu yeni şeylerin hafızda tutulamadığı ve Korsakoff Sendromu (Dismnezik Sendrom) denilen bir amnezi durumunun meydana geldiği ifade edilmiştir. Bahsedilen bu sendromda, kişi yeni öğrendiği becerileri uygulamaya koyamamaktadır. Fakat şahıs, rahatsızlanmadan önce öğrenmiş olduğu karmaşık işlevleri kolaylıkla yapabilmektedir. Ayrıca hastaların kendi geçmişi ile ilgili hayal veya konfüzyon tarzı deneyimlerden bahsettiği ve bu deneyimlere kendilerinin de inandığı belirtilmektedir. Bu duruma ise konfabulasyon olarak tanımlanmaktadır (18, 28, 30, 31).

## **1.2. Pineal Bez**

### **1.2.1. Anatomisi**

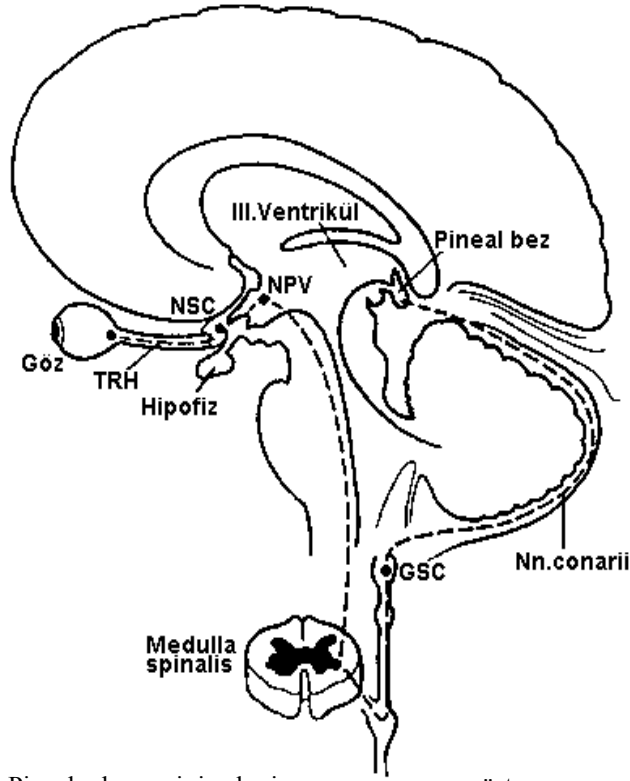
İnsanda, colliculus superior'lar, pulvinar thalami ve splenium corporis callosi arasında bulunan pineal bez önemli bir nöroendokrin organdır. Konik şekilli olan bu bez, 5-8 mm uzunluğunda, 3-5 mm genişliğinde ve 120-150 mg ağırlığında olup bir sap aracılığı ile 3. ventrikül tavanına bağlanmıştır. 3. ventrikül, pineal sap içerisine doğru girerek recessus pinealis'i meydana getirir. Recessus pinealis'in üzerinde kalan sap bölümü commissura habenulorum ile birleşir. Pineal sapın alt duvarı ise commissura posterior'a tutunur (32-37).

A. cerebri posterior'dan ayrılan a. choroidea posterior'un ince dalları tarafından beslenen pineal bez, kan akımı yönünden zengindir ve 4 ml /dak./gr'lık değerle böbreklerden sonra ikinci sırada gelir. Arteriyel dallar pineal bez kapsulasında birçok arteriollere ayrılarak organ içerisine penetre olurlar ve bağ dokusundan oluşmuş septalara eşlik edecek bir biçimde parankimaya dağılırlar. Pineal bezin venöz kanı ise v. cerebri interna ya da v. cerebri magna'ya dökülür (34, 35, 37-39).

Pineal bezin endokrin fonksiyonu tamamen sinirsel innervasyona bağlıdır. Aydınlik ve karanlık, pineal bezden melatonin salgılanmasının düzenlenmesinde başlıca öneme sahiptir. Genel bir ifadeyle, ışık melatonin üretimini baskılar, karanlık ise artırır. Işık uyarımları, retinadan başlayan kompleks bir sinirsel yolla pineal beze ulaşır. Retinada bulunan fotoreseptör hücreler ışık uyarımlarını elektriksel impulsa çevirirler ve tractus retinohypothalamicus aracılığı ile hypothalamusta yer alan nucleus suprachiasmaticus'a ulaşmasını sağlarlar. Hypothalamus'ta bulunan bu çekirdeğe tractus opticus yoluyla corpus geniculatum laterale'den gelen bir kısım ışık

uyarımları da vardır. Ancak, ışık uyarımlarının nucleus suprachiasmaticus'a iletilmesinde en önemli yol tractus retinohypothalamicus'tur (34, 37, 38).

Tractus retinohypothalamicus'u oluşturan lifler, chiasma opticum seviyesinde tractus opticus'tan ayrılarak hedef bölgesine gider. Bu yolu (tractus retinohypothalamicus) oluşturan liflerin büyük bir bölümü chiasma opticum'da çapraz yaparak karşı tarafın nuc. suprachiasmaticus'una ulaşır. Liflerin az bir kısmı ise çapraz yapmadan kendi tarafındaki nuc. suprachiasmaticus'unda sonlanır (34, 37, 38, 40). Suprakiazmatik çekirdeklerde sinaps yapan lifler daha sonra hypothalamus'ta yer alan nuc. paraventricularis'e ulaşır (34, 37). Nuc. paraventricularis'ten başlayan lifler ise mesencephalon'daki formatio reticularis'te sonlanır. Buradan da tractus reticulospinalis'i oluşturan lifler aracılığı ile (39) medulla spinalis'in üst torakal segmentlerine giderek, columna intermediolateralis'teki multipolar ganglion hücreleri ile sinaps yaparlar. Columna intermediolateralis'te yerleşmiş olan multipolar ganglion hücrelerinin aksonları ise medulla spinalis'ten ayrılır ve preganglionik lif olarak ganglion cervicale superior'a gelir (37-41). Sonuç olarak, ganglion cervicale superius'dan çıkan postganglionik sempatik lifler, tentorium cerebelli'den geçerek nn.conarii yolu ile pineal bez'e ulaşır (34, 37-41). Pineal bez kapsulasından geçerek parankimada dağılan myelinsiz sinir lifleri daha çok perikapiller alanlarda ve pinealositler arasında sonlanır (37, 38, 40) (Şekil 4).



Şekil 4: Pineal bez sinirsel innervasyonunu gösteren şematik çizim. (TRH): Tractus retinohypothalamicus, (NSC): Nucleus supra-chiasmaticus, (NPV): Nucleus paraventricularis, (GSC): Ganglion cervicale superius. (37).

### 1.2.2. Prenatal Gelişimi

İnsanda, pineal bez embriyonal hayatın 36. gününde (33), diencephalon tavanının arka bölümündeki nöroepitheliumun divertikülü şeklinde gelişmeye başlar. Bu divertikül kendini commissura posterior ile commissura habenulorum arasında gösterir (33, 36, 37, 40). Öncelikle, divertikül içerisindeki nöroepithelial hücreler çoğalarak pinealoblastları meydana getirirler. Pinealoblastlar da parankima hücrelerine dönüşür. Kan damarlarını ihtiva eden stroma dokusu ise mezenşimden köken almaktadır (37, 40).

Pineal bez parankimasında; pinealositler ve glia hücreleri olmak üzere iki tip hücre bulunmaktadır (33, 34, 36-40, 42-48). Mikroskopik düzeyde bu hücrelerin ayırt edilmesi 150. günden önce mümkün değildir. Fakat, prenatal gelişim sürecinin 6. ayında pinealositler ile glia hücrelerinin morfolojik ayrımı yapılabilmektedir (33, 37).

### **1.2.3. Histolojik Yapısı**

Piamater ile sarılı olan pineal bez, subaraknoid aralıkta yerleşmiştir. Kapsül görevi yapan piamater'den ayrılan ve de bağ dokusu karakterinde olan septalar organ içerisine penetre olarak bezi düzensiz lobüllere ayırır. Kan damarları ise, pineal bez parankimasına bu septalar aracılığı ile ulaşmaktadır (33, 36, 37, 39).

Pineal bez parankimasının çoğunluğunu oluşturan pinealositler bezin sekresyon fonksiyonundan sorumludurlar. Parankimada bulunan bir diğer hücre tipi yani glia hücreleri ise destekleyici hücreler olup daha az sayıdadırlar (33, 34, 36-40, 42, 49-51).

#### **1.2.3.1. Pinealositler (Esas Hücreler)**

Poligonal şekilli ve sitoplazmik uzantılara sahip olan pinealositler, parankimal hücrelerin yaklaşık olarak % 85-90'nını teşkil eder. Hücrelerin çekirdekleri çentikli, iri ve yuvarlaktır. Çekirdekçikleri ise çok belirgindir (33, 36, 46, 49, 51). Pinealosit sitoplazmaları; lizozomlar, salgı granülleri ve lipid damlacıkları yönünden zengindir. Çekirdek etrafında bol miktarda mitokondri bulunur. Golgi kompleksi iyi gelişmiştir. Hücrelerin sitoplazmik uzantıları çok sayıda mikrotubulus içerir. Bu uzantıların genişlemiş uç kısımlarında, yoğun miktarda veziküller bulunur. Bu veziküllerde, monoamino ya da peptid hormonlarını bağlayan spesifik taşıyıcı proteinler yer alır. Bu veziküllerin içerikleri kapillerlere ya da beyin omurilik sıvısına boşalmaktadır (33, 36, 37, 49, 51).

Birbirlerine nekzuslar, desmozomlar ve ara bağlantı kompleksleri ile bağlanan pinealositlerin ultrastrüktürel yapısı incelendiğinde, yüksek hücre aktivitesine sahip oldukları görülmektedir. Nöroendokrin işleve sahip olan bu

hücrelerden melatonin, serotonin ve bazı pineal peptidleri salgılanmaktadır (37, 49, 50).

### **1.2.3.2. Glia hücreleri (İnterstisyel Hücreler)**

Parankimal hücrelerin % 10-15'ini oluşturan glia hücreleri, pinealositler arasında ve perikapiller alanlarda bulunur. Hücre çekirdekleri oval şekillidir ve yoğun kromatinden dolayı koyu renkte boyanır. Oldukça küçük olan çekirdekçikleri periferal yerleşimlidir (33, 36, 37, 46, 49, 51). Bazofilik karakterde olan hücre sitoplazmaları bol miktarda ribozom içerir. Ayrıca, sitoplazmada geniş bir golgi kompleksi, lipid damlacıkları ve vakuoller gözlenir. Nadir olarak da glikojen tanecikleri bulunmaktadır (33, 37, 49).

Glia hücreleri, uzun sitoplazmik uzantılara sahiptir. Hücreler bu sitoplazmik uzantılarıyla pinealositler, sinir lifleri ve diğer glia hücreleri ile bağlantı kurarlar (20). Bu hücrelerin morfolojik özellikleri ve fonksiyonları dikkate alındığında astrositlere benzedikleri görülür (33, 35-37, 46, 49, 50). Pineal bezde yerleşmiş olan glia hücreleri, destekleyici işlevlerinin yanı sıra, kan damarları ile parankima arasındaki madde alışverişinden sorumludurlar (37, 50, 51).

### **1.2.3.3. Stroma Dokusu (Ara Doku)**

Pineal bez parankimal hücreleri arasında, fenestralı endotele sahip kapillerler, kollagen iplikler, sinir lifleri ve az miktarda bağ dokusu hücreleri bulunmaktadır. Makrofajlar, mastositler ve plazmositler pineal bez ara dokusunda görülen bağ dokusu hücreleridir. Yaşla birlikte, glia hücre sayısında ve bağ dokusu alanlarındaki fibrillerde artış ile birlikte kapiller bazal mebranlarında kalınlaşmalar meydana gelmektedir. Ayrıca, ileri yaşlarda pineal bez sekresyonunun atılımı sırasında,

vezikül artıkları üzerine kalsiyum tuzlarının çökmesiyle meydana gelen beyin kumu (acervulus cerebri) oluşumları ortaya çıkmaktadır (46, 49).

#### **1.2.4. Pineal Bezin Fizyolojisi**

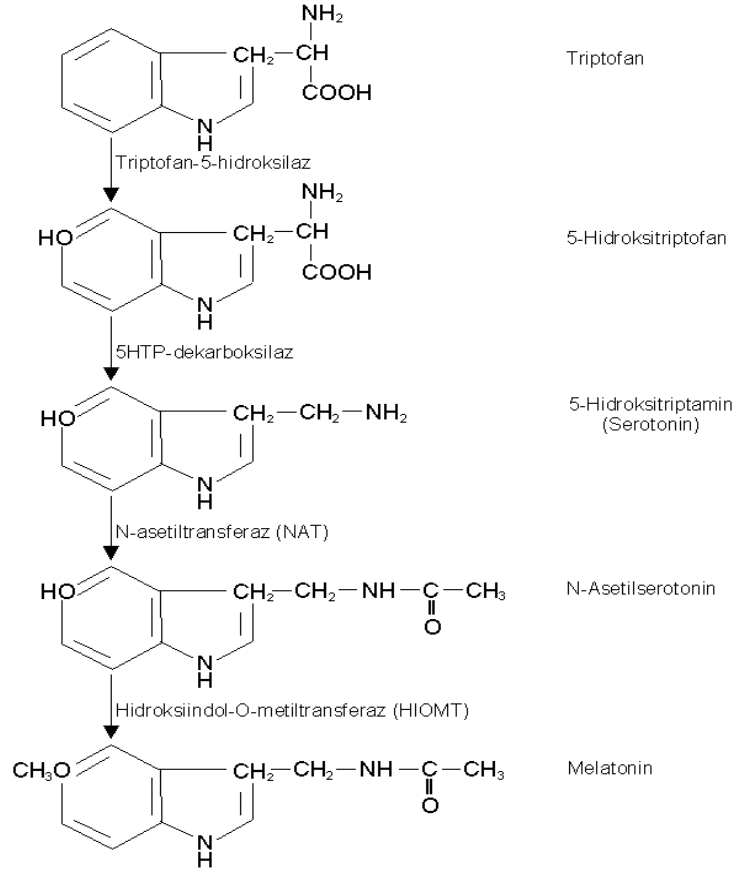
Nöroendokrin bir organ olarak kabul edilen pineal bez, aydınlık ve karanlık ortamlara göre organizmanın bir çok fonksiyonları üzerinde düzenleyici bir role sahiptir. Hipotalamus'ta yer alan nuc. suprachiasmaticus ile birlikte biyolojik bir saat gibi çalışan bu bez, sirkadiyan bir ritimde ve karanlıkta salgıladığı melatonin hormonu vasıtasıyla vücudun diğer kısımlarına zaman sinyalleri gönderir. Böylece günün ve yılın farklı zamanlarına bağlı fizyolojik siklusların düzenlenmesinde görev alır (34, 37, 38).

#### **1.2.5. Melatonin**

232 molekül ağırlığına sahip olan melatonin ya da diğer bir adıyla N-asetil-5-metoksitriptamin, pineal bez tarafından sirkadiyan bir ritimde ve karanlıkta salgılanan bir hormondur (34, 37).

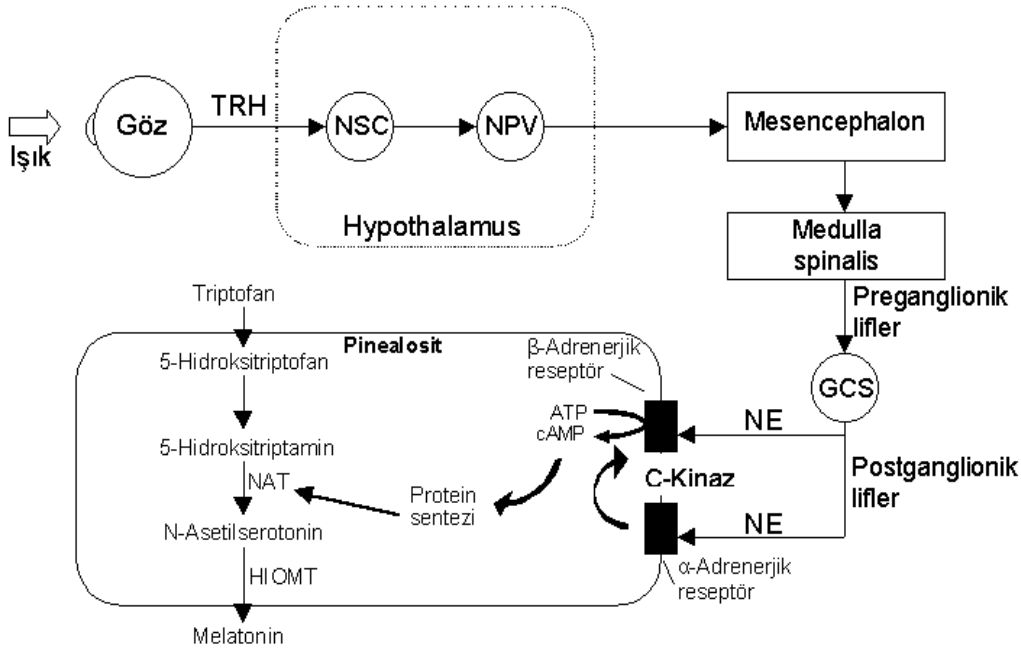
##### **1.2.5.1. Biyosentezi ve Metabolizması**

Melatonin hormonu, pineal bez yapısında bulunan ve parankimal hücrelerin çoğunluğunu oluşturan pinealositler tarafından sentezlenir. Bu hücreler tarafından gerçekleştirilen melatonin sentezi için triptofan aminoasitine gereksinim vardır. Kan dolaşımından pinealosit içerisine alınan triptofan, ilk önce triptofan 5-hidroksilaz enzimi aracılığıyla 5-hidroksitriptofan'a, 5-hidroksitriptofan ise L-aromatik aminoasit dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) vasıtasıyla 5-hidroksitriptamin'e (serotonin) çevrilir. Serotonin de N-asetiltransferaz (NAT) ile N-asetilserotonin'e ve son olarak N-asetilserotonin, hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından melatonine dönüştürülür (34, 37, 38, 52). (Şekil 5).



Şekil 5: Melatonin hormonunun biyokimyasal sentezi (37).

Pineal bez ulaşan sempatik sinir lifleri parankimal hücreler arasında sonlanmakta ve bu sinir uçlarından norepinefrin salınmaktadır. Sinir sonlanmalarındaki norepinefrin salınımı aydınlıkta baskılanırken, karanlıkta artış gösterir. Pineal bez içerisinde ve karanlıkta ortaya çıkan norepinefrin ise pinealosit membran yapısında bulunan  $\beta$ -adrenerjik reseptörlere bağlanır. Bu reseptörlerin uyarılması ile hücre içinde önce adenilat siklaz aktive olur ve cAMP artar. Daha sonra NAT ve sonuç olarak melatonin sentezi tamamlanır. Pinealosit hücre membranlarında  $\alpha$ -adrenerjik reseptörler de mevcuttur ve pineal bez fonksiyonunun düzenlenmesinde  $\beta$ -uyarımı artırıcı bir görevi vardır (34, 37, 38, 52) (Şekil 6).



Şekil 6: Pinealosit içerisinde gerçekleşen melatonin üretiminin kontrol mekanizması. (TRH): Tractus retinohypothalamicus, (NSC): Nucleus suprachiasmaticus, (NPV): Nucleus paraventricularis, (GCS): Ganglion cervicale superius. (37).

Hem yağda hem de suda çözünebilir karakterde olan melatonin hormonu, düşük molekül ağırlığına sahip olduğu için pinealositlerde üretildikten sonra pasif diffüzyonla ve hızlı bir şekilde hücre dışına atılır (52).

Pineal bez kan-beyin bariyerinin dışındadır ve bu yüzden üretilen melatonin direkt olarak kan dolaşımına geçer. Daha sonra organizmanın bütün biyolojik sıvılarına ve dokularına ulaşır. Birçok vücut sıvısı ve dokularında (beyin omurilik sıvısı, tükürük, lenf, amniotik sıvı, idrar, sperma, retina ve siyatik sinir) melatonin varlığı yapılan biyokimyasal ve doku analizleriyle gösterilmiştir. Ayrıca bu hormon, anneden fõtusa placenta yolu ile yeni doğanlarda ise sütle geçmektedir (34, 37, 38, 52).

Kandaki yarılanma süresi 10-40 dakika olan melatonin hormonu başlıca karaciğerde ve böbreklerde metabolize olur (38, 52).

% 90'ını karaciğerde metabolize olarak mikrozomal enzimler tarafından 6-hidroksimelatonine dönüştürülür. Bu ajan da sülfat veya glukoronik aside bağlanarak idrarla atılır (52). 6-sulfatoksimelatonin, idrarda bulunan melatonin hormon metabolitidir (34, 38).

#### **1.2.5.2. Melatonin Sekresyonunun Düzenlenmesi**

Melatonin sekresyonunun sirkadiyan ritmi hipotalamus'ta yer alan nuc. suprachiasmaticus tarafından düzenlenir. Bu çekirdek, ışığın şiddetine bağlı olarak pineal bezdeki melatonin sentezini baskılar (52).

İnsan dahil tüm memelilerde melatonin hormonu geceleri daha fazla miktarda salgılanmaktadır. Melatonin sentezinin gerçekleşmesinde rol oynayan pineal NAT ve HIOMT enzim aktivasyonlarının da geceleri çok yüksek olduğu belirtilmiştir (34). İnsanda, melatonin hormonu akşam 21:00-22:00 saatlerinde salgılanmaya başlar. Kandaki maksimum konsantrasyonu (50-70 pg/ml) 24:00-04:00 saatleri arasında gözlenir. Sabah 07:00-09:00 saatlerinde ise melatonin sekresyonu azalarak minimum seviyelere iner (38, 52). Kan melatonin düzeyleri yaşa bağlı olarak değişim gösterir. Yeni doğanda kan melatonin konsantrasyonu düşük olup, 3. aya kadar artmakta ve bu aydan sonra sirkadiyan melatonin ritmi belirginleşmektedir (34). Kan melatonin konsantrasyonu 8 yaş civarlarında maksimum düzeylere ulaşır. Puberta döneminde belirgin bir şekilde azalan melatonin düzeyleri, yaş ile birlikte sürekli bir azalma gösterir (38).

### **1.2.5.3. Melatonin Hormonunun Fonksiyonları**

#### ***Endokrin Sistem Üzerine Etkisi:***

Hipotalamus, hipofiz ve gonadlar üzerinde etki gösteren melatonin, bu sistemler üzerinde genel bir baskılayıcı etkiye sahiptir (34, 37, 38, 43, 52-55). Hipotalamus'taki GnRH (Gonadotropin-releasing hormon) üretimini baskılamakta ve ön hipofiz'deki LH (Luteinizing hormon) salınımını inhibe etmektedir. Hem hipotalamus düzeyinde hem de ön hipofiz düzeyinde göstermiş olduğu bu etki sonucu gonadal hormonların üretimini de azaltmaktadır (34).

Bunun yanı sıra, melatonin hormonu tiroid ve böbreküstü bezi gibi diğer endokrin organlar üzerinde de etkilere sahiptir. Tiroid bezi fonksiyonları üzerinde genel bir inhibitör etki gösteren bu hormon, böbreküstü bezindeki glukokortikoid ve mineralokortikoid sekresyonunu azaltmaktadır (37, 38, 56, 57).

#### ***İmmun Sistemin Güçlendirilmesi:***

Melatonin hormonu hipotalamus'taki TRH (thyrotropin-releasing hormon) sentezini ve salgılanmasını etkileyerek, immunomodülatör, timotropik ve anti-stres aktivitesini göstermektedir. Pinealektomi gibi melatonin sentezinin engellendiği durumlarda immün fonksiyonlarda düşüş gözlemlendiği, eksojen olarak dışarıdan tatbik edilen melatonin hormonunun ise immün cevabı yeniden uyardığı bildirilmiştir (34, 58).

#### ***Kardiovasküler Sistem Üzerindeki Koruyucu Etkisi:***

Dolaşımdaki kolesterol düzeylerini düşüren melatonin, ateroskleroz ve hipertansiyon riskini azaltmaktadır (52).

### ***Uyku Ritminin ve Vücut Isısının Düzenlenmesi:***

Gece boyunca yeterli seviyelerde salgılanamayan melatonin, uyku süresinin kısalmasına neden olmaktadır. Sekresyonun düzenli olmadığı ya da az olduğu durumlarda ise “uyuma güçlüğü” ve “sık sık uyanma” hadiseleri ortaya çıkmaktadır. Daha önce yapılmış olan deneysel çalışmalarda, dışarıdan uygulanan melatonin hormonunun “uyku süresi”nde uzamaya neden olduğu ifade edilmiştir (38).

Hipotalamus'taki preoptik saha ısı merkezidir ve bu alanda yerleşmiş olan nöronlarda melatonin hormonuna duyarlı reseptörler bulunur. Hormon bu reseptörler aracılığı ile bölgeyi etkileyerek vücut ısısında azalmaya yol açmaktadır (37, 52).

### ***Antioksidan Etkisi:***

Deneysel olarak yapılan araştırmalarda, melatonin hormonunun antioksidan özelliklere sahip olduğu ve lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen oksidatif hasarı önlediği ifade edilmiştir (59-63).

Hem hidrofilik hem de lipofilik karakterde olan bu hormon, çekirdek dahil olmak üzere hücrenin bütün organellerine ulaşabilmekte ve böylece DNA yapısının oksidatif hasara karşı korunmasında da rol oynamaktadır (64). Melatonin hormonu hücresel düzeyde mitokondrilere nüfuz edebilen bir antioksidandır ve mitokondrileri oksidatif hasardan korur (37). Melatoninin mitokondriler üzerinde göstermiş olduğu bu antioksidan etki önemli bir özelliktir. Çünkü, apoptotik hücre ölümünün başlatılmasında mitokondrial oksidasyon büyük bir role sahiptir. Ya da bir başka ifadeyle belirtilecek olursa, mitokondrial oksidasyon hücreyi apoptozise götüren önemli bir mekanizmadır (34).

Ayrıca, melatonin hormonu güçlü antioksidan özelliklere sahip olmasının yanı sıra, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini de stimüle etmektedir (66).

#### **1.2.5.4. Melatonin Hormonunun Hipokampus Üzerindeki Etkisi**

Organizmada meydana gelebilecek oksidatif hasardan en çok merkezi sinir sistemine ait dokular etkilenmektedir (43-45). Beyin, vücut ağırlığının oldukça küçük bir yüzdesine (%2) sahip olmasına rağmen, solunan oksijenin büyük bir bölümünü (%20) tüketir. Oksijenin yan ürünleri son derece toksiktir ve sinir dokusunun bu toksisiteden daha fazla etkilendiği bilinmektedir. Merkezi sinir sistemine ait nöral dokulardaki antioksidan enzim seviyeleri nispeten daha düşüktür. Ayrıca, beyin oksidatif sürecin rahatlıkla başlatılabileceği ve kendi kendine devam edebileceği çoklu-doymamış yağ asitlerini de oldukça yüksek konsantrasyonlarda içerir (45-46). Bu nedenle, serbest radikal aracılı hastalıklara ve erken yaşlanmaya karşı korunabilmenin yolu, organizmanın oksidatif hasar sürecinin bir sonucu olarak ortaya çıkan moleküler bozulmaya karşı koyabilme yeteneğinde saklıdır (47-48). Melatonin hormonu hem serbest radikal giderici etkisi hem de antioksidan enzimlerin aktivitesini artırıcı etkisiyle güçlü bir antioksidan etki gösterir. Kan-beyin bariyerini de rahatlıkla geçebildiğinden merkezi sinir sistemine ait dokularda antioksidan özelliğini göstermektedir. Bu yüzden, melatonin hormonunun salgılanmasında oluşabilecek bir engel sinirsel dokularda oksidatif bir sürecin başlamasına neden olabilir (49).

Melatonin hormonunun antioksidan özelliği birçok çalışmalarda gösterilmiştir. Bu bağlamda, pineal bez ve bu bezin salgılamış olduğu melatonin

hormonunun hipokampus üzerindeki etkileri sadece biyokimyasal düzeyde yapılmış olan ve sınırlı sayıdaki araştırmalarla ortaya konmuştur. Pinealektomi sonrası hipokampus dokusunda oksidatif hasarın ve hücre kayıplarının meydana geldiği bildirilmiştir. Dışarıdan uygulanan melatonin hormonunun ise pinealektomiye bağlı olarak oluşan doku hasarını düzelittiği ifade edilmiştir (49-52).

Ancak, melatonin hormonunun antioksidan özelliği birçok çalışmalarda belirtilmesine rağmen, pinealektomi sonrası yani melatonin sentezinin olmadığı durumda, hipokampus dokusunda oluşabilecek apoptotik değişiklikler ile ilgili herhangi bir immunohistokimyasal çalışmaya rastlanmamıştır. Yine böyle bir durumda dışarıdan uygulanan melatoninin pinealektomiye bağlı olarak hipokampusta gelişebilecek apoptozise karşı nasıl bir etki gösterebileceğini ortaya koyan bir çalışma da mevcut değildir. Bu yüzden, yapmış olduğumuz bu araştırmada, immunohistokimyasal yöntemlerden de faydalanarak, pinealektomi yapılan ve pinealektomi sonrası melatonin uygulanan sıçanlarda hipokampus morfolojik yapısının özellikle apoptozis yönüyle incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

### **1.3. Apoptozis**

#### **1.3.1. Genel Bilgiler**

İskoçyalı patolog Kerr tarafından, ilk defa 1972 yılında nekrozisten farklı bir hücre ölümünü anlatmak için kullanılan apoptozis terimi, fizyolojik ve patolojik olaylarda meydana gelmekle birlikte kelime olarak eski Yunanca'da "yaprak dökümü" anlamına gelir (67). Apoptozis süreci bizzat hücrenin kendisi tarafından programlanmakla birlikte bu hücrel programlanma travmalar, lezyonlar veya genetik faktörlerle aktive edilmektedir ve hücrenin intiharı olarak özetlenebilen bir süreçtir. Hormon azalmasına bağlı olarak meydana gelen involusyonlarda ve immün reaksiyonlarda embriyonal ve fetal gelişim sürecinde, yaşlılıkta, fizyolojik olarak özel hücrelerin kaybindan apoptozis sorumludur (68).

Organizmada apoptoz oranının artması dokuda hücre sayısındaki azalmaya, apoptoz oranının azalması ise dokuda hücre sayısında artmaya yol açacağından apoptozis mekanizmaları canlıda denge unsurudur denilebilir. Yani apoptozis vücudun bütünündeki hücre sayısının sabit kalmasına da yardımcı olmaktadır (69). Hücrel replikasyon işlemi yani DNA onarımı apoptozis sürecinden önce durur. Apoptozis sürecine girilip girilmeyeceği hücrenin tümör geliştirme riskine, patolojinin büyüklüğüne veya hücrenin tipine göre değişecektir (70). Apoptotik süreç esnasında, kromatin yoğunlaşması, hücrelerin küçülmesi, büzülmesi, nüklear piknoz gibi birtakım morfolojik değişimlerin hücrede gerçekleşmesi kaçınılmazdır ve yapılan çalışmalar apoptozisin aniden hızlı bir şekilde oluştuğunu da göstermiştir.

Apoptotik sürecin başlamasından apoptotik cismin oluşmasına kadar devam eden olaylar zinciri birkaç dakika sürerken, fagositoz aşaması tek başına daha uzundur ve gözlenen aşamalar şu şekilde sıralanabilir (68);

1. Apoptozis'in başlatılmasına karar verme
2. Hücre içi proteazların aktivasyonu,
3. Parçalanma,
4. Fagositoz.

### ***1. Apoptozis'in başlatılmasına karar verme:***

Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmaları) sonucu indüklenir.

Hücresinin apoptotik sürecin içine girmesi için bir takım uyarılar alması gerekmektedir. Hücreyi ölüme götürebilecek olan bu uyarıları hücrenin kendisi verebileceği gibi dışarıdan da alınabilmektedir. Apoptotik sürecin ilgili genetik mekanizması ancak bu hücre içi veya hücre dışı uyarılarla harekete geçecektir ve apoptozis başlayacaktır (68). Hücrenin asit-baz dengesinin bozulması, sıvı elektrolit dengesindeki değişimler, siklus bozuklukları, hücre membranındaki aktif transport mekanizmalarının bozulması, büyüme faktörü eksikliği gibi etkiler hücre içinden kaynaklanan sinyallerdir. Yüksek kuantum değerine sahip ışınlar, uzun süreli oksijensiz ortam, termal dengesizlikler, toksik ajanlar, total tahribata sahip ilaçlar ise hücreye dış ortamdan ulaşan tehlikeli uyarılardır. Hücre içinden kaynaklanan apoptozis uyarıları gibi hücre dışından gelen uyarılar da DNA hasarı meydana getirerek apoptozise yol açmaktadır (71).

### ***2. Hücre içi proteazların aktivasyonu:***

Hücre içi ya da hücre dışından gelen apoptotik sinyaller, hücre içerisinde bulunan proteazları aktive eder. Bu proteazlara kaspaz adı verilir. Kaspazlar, zimojen

olarak stoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimdir (caspase: cysteine containing aspartate specific proteases) (68). Şu ana kadar belirlenmiş 14 kaspaz vardır (72). Bu kaspazlardan başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Öldürücü kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. Üçüncü grup kaspazlar ise ve sitokin olgunlaşmasından sorumlu kaspazlar olarak adlandırılırlar (73). Sonuç olarak, bu kaspazların aktive olması apoptotik sürecin başlamasına yol açar (68). Bu olay şu şekilde gerçekleşir;

Mitokondri apoptozis olayında önemli rol oynar. Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşü olmayan bir döneme girildiğini işaret eder. Mitokondrial yol, sitotoksik ajanlar ve oksidatif baskı gibi çeşitli intraselüler ve extraselüler etkiler sonucu aktive olur. Sitoplazmaya salınan sitokrom c, mekanizması tam aydınlatılamamış olsa da sitoplazmaya yalnız başına değil apoptozis indükleyici faktör (AIF) ile birlikte verilir. Sitokrom c sitoplazmada apaf-1'e (apoptotic protease activating factor 1) tutunur. Sitoplazmada apoptozom oluşumuna Apaf-1'e tutunan sitokrom c neden olur. ATP'nin de katkısıyla meydana gelen apoptozom adlı kompleksler inaktif olan prokaspazları aktif kaspazlara dönüştürmede görev alır. Sonuç olarak, kaspazların aktivasyonu apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur ve apoptozise yol açar (73).

### **3. Hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler:**

HücreSEL ölümün morfolojisine genel bir bakış yapıldığında sitoplazmik ve nükleusa ait değişiklikler tespit edilecektir. Eozinofil miktarındaki artış, sitoplazmik RNA miktarında azalma, hücre içindeki protein yapısında bozulma, sitoplazmada vakuolizasyon, parçalanmış organeller gibi değişiklikler hücrede görülebilecek sitoplazmik değişikliklerdir. Nükleusa ait değişiklikler ise piknotik çekirdeğin parçalanması olan *karyokinez*, çekirdeğin büzülmesi ya da DNA'nın parçalanmasıyla oluşan DNA fragmentlerinin difüzyonla çekirdek dışına çıkmasıyla gerçekleşen bir nevi çekirdek değişimi olarak tanımlanan *piknoz* ve piknotik veya kısmen piknotik çekirdeğin parçalanması olarak tanımlanan karyoreksis olayları görülmektedir. Hücre genelinde görülen aktin filamanının denatürasyonuna bağlı olarak hücre normal şeklini kaybeder ve hücre membranının asimetrisi bozulur. Hücrenin içeriğindeki sıvıyı kaybetmesi hücre plazmozisi ile sonuçlanır. Hücre yüzeyinde kraterler oluşur. Çekirdek de büzülerek parçalanır. Son olarak hücrenin parçalanmasıyla apoptotik cisimcikler adı verilen çok parçalı materyaller oluşur. (68).

### **4. Fagositoz:**

Meydana gelen apoptotik cisimcikler, çevredeki parankim hücreleri ve makrofajlar tarafından fagosite edilerek dokudan temizlenir. Apoptozis esnasında inflamasyon oluşmaz (73).

#### **1.3.2. Apoptozis'in Düzenlenmesi**

Apoptozis bir süreçtir ve bu sürecin kontrolünde önemli bir rolü olan esas yapı mitokondrilerdir. Apoptozis sürecinde Bcl-2, Bax ve Bcl-X görev alan başlıca mitokondri molekülleridir. Bcl-2 ailesi anti-apoptotik ve pro-apoptotik olmak üzere

iki gruba ayrılır. Anti-apoptotik grubunda Bcl-2, Bcl-XL proteinleri bulunurken, Bax, Bak, Bad, Bcl-XS proteinleri pro-apoptotik grubun üyeleridir (71). Bu üyelerden Bcl-2, Bcl-XL proteinleri yani anti-apoptotik grup, sitokrom c gibi apoptogenik faktörlerin mitokondrileri etkilemesi sonucu sitoplazmaya salınımını engeller ve bu olay apoptozisin inhibisyonu anlamına gelmektedir. Bax, Bak, Bad, Bcl-XS proteinleri yani pro-apoptotik grup ise kaspas serbestleşmesini uyarır ve mitokondri membranındaki transport porlarını değiştirerek sitokrom c'yi sitoplazmaya salar ve bu olay apoptozisin başlatılması anlamına gelmektedir. Bir hücrenin, dolayısıyla bir dokunun apoptozise eğilimli olması, sitokrom c'nin sitoplazmaya salınma potansiyeline, genel anlamı ile Bcl-2 ailesindeki dengeye bağlıdır denilebilir

Sonuç olarak, Bax proteininin bir hücre sitoplazmasında immunohistokimyasal olarak gösterilmesi o hücrede apoptozisin meydana geldiğinin kanıtıdır denilebilir. Nekroz da bir hücre ölüm şekli olsa da apoptozis, histolojik ve fizyolojik olarak nekrozisten oldukça farklıdır (73-78).

## **1.5. İmmunohistokimya**

### **1.5.1. Genel Bilgiler**

Normal doku boyama yöntemleriyle tespiti çok zor olan enzim veya protein gibi komplekslerin dokuda varlığını gösterebilmek için kullanılan, kendine özgü teknikleri olan ve çok duyarlı reaksiyonlar temeline dayalı ilerleyen araştırma metoduna immunohistokimya denir.

İmmunohistokimyasal çalışmada en önemli materyal antikor yapılarıdır. Antijen ile antikor arasındaki yüksek affinite bilindiği için antikor işaretlendiği

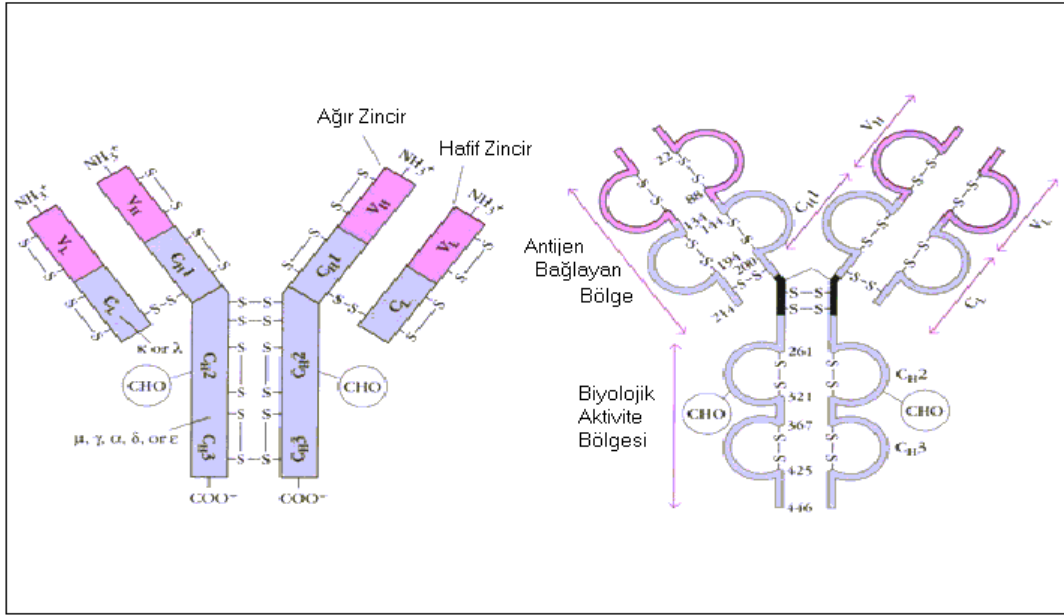
taktirde dokuda antijen yapısına net bir bağlanma gösterecek ve dokuda aranan molekül de bu işaretleme sayesinde tespit edilmiş olacaktır. İmmunohistokimya çalışmalarında alınan sonuç preparatlar ışık ya da elektron mikroskopuyla görsel olarak semikantitatif değerlendirilir.

Çalışmaların değerlendirmesinde bir molekülün hücrelerde yerleşik olup olmaması, hücreye yerleşmiş olan aranan molekül mevcut ise bunun gösterilmesi prensibinden faydalanılır. Bu amaçla hücrede varlığı aranan moleküle özelleşmiş olarak hazırlanan işaretli antikor kullanılır. Bu işaretli antikorlar ışık veya elektron mikroskop düzeylerde gösterilmesi, varlığı aranan molekülün de hücrede gösterilmesi anlamına gelir. İmmunohistokimyasal boyama teknikleriyle enzim veya protein gibi mikroskop ortamında gösterilmesi güç olan moleküller kolaylıkla tespit edilmektedir (79, 80).

### **1.5.2. İmmunohistokimyasal Boyamada Kullanılan Antikorlar**

Antikorlar İmmunohistokimyasal çalışma metodunun esas bileşenini oluşturmaktadırlar. Oldukça karmaşık bir yapıya sahip olan antikor molekülü iki zincirden oluşmuş olup molekülün bu iki zinciri şematik olarak “Y” şeklinde bir görüntü çizer. “Y” harfine benzeyen antikor molekülünün uzun kolu komplemana bağlanırken kısa kolları ise antijene bağlanmaktadır. İlk defa Albert H. Coons tarafından dokuda aranan antijenin varlığını saptamak florasan boya ile boyanan işaretlenmiş antikorlar, günümüzde monoklonal ve poliklonal olmak üzere bu boyama tekniğinde iki tür antikor kullanılır (81). Monoklonal antikorların paratopları özel bir klona ait olduklarından, antijen üzerinde yer alan özel bir epitop ile reaksiyona girer. Homojenite bakımından poliklonal antikorlara göre daha yüksek bir değere sahiptirler (Şekil 7).

Poliklonal antikorlar ise, organizma tarafından yabancı kabul edilen protein molekülünün farklı bölgelerine bağlanabilirler. İçeriğindeki heterojen karışımli birden fazla antikor sayısı olması nedeniyle birçok epitop barındırıp, dokular için özelleşme konusunda yetersiz kalmaktadırlar (81).



Sekil 7: Monoklonal Antikorun Yapısı

### 1.5.3. İmmunohistokimyasal Boyama Metodları

İmmünezimatik ve immünoflüoresan olmak üzere iki temel boyama metodu mevcuttur.

#### 1.5.3.1. İmmünezimatik Boyama

Antijen-antikor reaksiyonu, bu yöntemde özel enzimler aracılığıyla renkli son ürünlere dönüştürülür. En fazla kullanılan enzimler arasında alkalin fosfat, b-galaktozidaz, glikoz oksidaz, horse-radish peroksidase (HRP) vardır. Dokudaki antijenin konsantrasyonu boyamayı etkilemektedir. Antijen konsantrasyonundaki artış dokuda boyanma konsantrasyonunda artmaya neden olmakta ve daha koyu preparatlar elde edilmektedir (82). Boyamada direkt ve indirekt olacak şekilde

başlıca iki yöntem kullanılır. Bu iki yöntem çalışılacak olan dokunun türüne, özgüllük oranına, bekleme veya ekim süresine göre belirlenir (82).

#### **1.5.3.1.1. Direkt Yöntem**

Antijene primer antikorun doğrudan bağlanması söz konusudur. Bu yöntemin kullanımı giderek azalmakla birlikte direkt yöntemde, tek bir antikor kullanıldığı için elde edilen boyama sonucunun kalitesi düşüktür.

#### **1.5.3.1.2. İndirekt Yöntem**

Bu boyama yönteminde primer ve sekonder antikor olmak üzere iki grup antikor görev almaktadır. Öncelikle primer antikorun antijene bağlanması gerçekleşir. Daha sonra, devreye işaretlenmiş olan sekonder antikor sokulur. Primer antikor-antijen kompleksi, sekonder antikor tarafından “antijen” olarak kabul edilir ve primer antikor-antijen kompleksi ile sekonder antikor birleşmesi gerçekleşir. Substrat kromojen solüsyonu, bu ikili antikor bileşik yapısının üzerine eklenir. Bu yöntemde, immunoglobulinlerinden elde edilen primer ve sekonder antikorun birbirlerine sinerjistik etki göstermesi gerekmektedir. İndirekt yöntem kullanım açısından daha fazla tercih edilmekle birlikte, indirekt yöntemin bir diğer özelliği de çalışma metodunda farklı maddeler kullanılması nedeniyle genel olarak üç metot uygulanmaktadır (82).

Bu metotlara başlıklar altında bakılacak olursa aşağıdaki gibi bir sıralama görülür;

#### ***a) Avidin-Biyotin Metodu (ABC Metodu)***

Biyotin, karaciğerde bulunan bir vitamindir ve biyotine yumurta akından saflaştırılarak elde edilen avidinin bağlanma eğilimi çok yüksektir. Bir kompleks halinde olan avidin-biyotin, peroksidaz enzimiyle işaretli hale getirildikten sonra

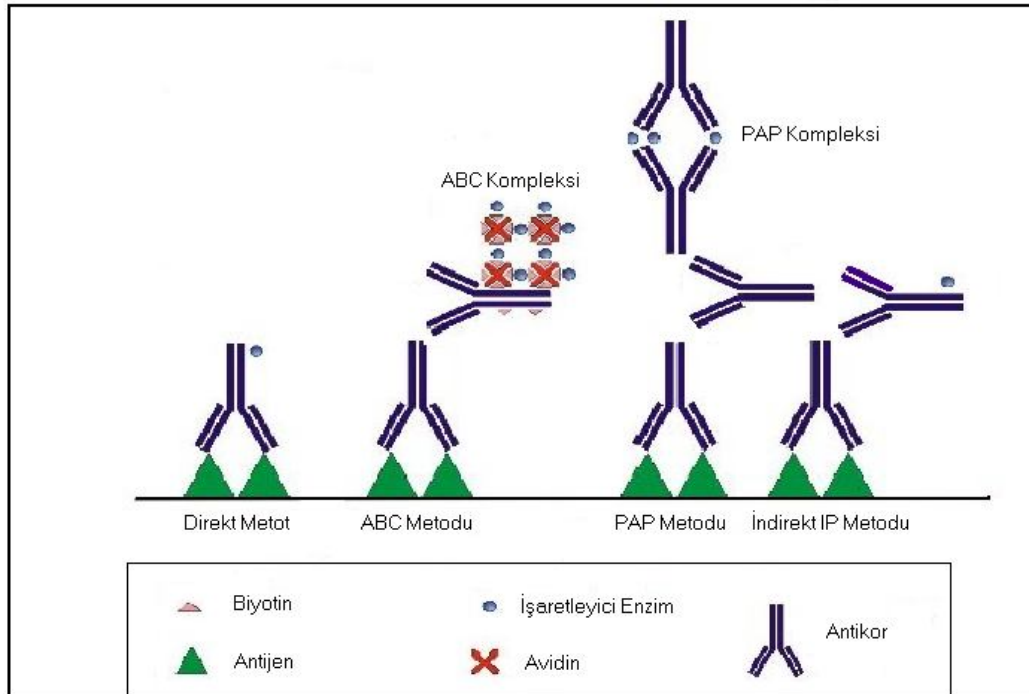
biyotin ihtiva eden sekonder antiokoron üzerine ilave edilir. Daha sonra doku antijeninin görünür hale getirilmesi için substrat-kromojen solüsyonu eklenir. Avidinin, biyotine olan afnitesinin yüksek olması bu yöntemi duyarlı kılmaktadır (83).

### ***b) İndirekt İmmunoperoksidaz Metodu***

Primer antikor-antijen bileşiği üzerine peroksidaz taşıyan sekonder antikor eklenir. Meydana gelen bu komplekse de substrat-kromojen bileşiği eklenerek metot gerçekleştirilir (82).

### ***c) Enzim-Antienzim Kompleks Metodu (PAP Metodu)***

Bu yöntemde sekonder antikorun üzerine çözünebilirliği yüksek olan enzim-antienzim kompleksi ve substrat-kromojen solüsyonu ilave edilir. Enzim-antienzim kompleksi olarak en sık peroksidaz-antiperoksidaz (PAP) kullanılmaktadır (82) ( Sekil 8).



**Şekil 8:** İmmüenzim Boyama Metotları.

### **1.5.3.2. İmmunfluoresan Boyama**

Bu yöntemde de, “primer antikor-antijen” kompleksinin oluşmasını sağlamak amacıyla öncelikle primer antikorun antijenle birleşmesi sağlanır. Daha sonra, kullanılacak olan sekonder antikora fluoresan ışık yayabilen bir kromofor eklenir. Bu kromoforun yüksek dalga boyundaki ışığın yüksek kuantum enerjisini absorbe edip, yerine yüksek dalga boylu ışık vererek ışımaya gösterme özelliğinden faydalanılır. Bu sayede, incelenen doku ve hücredeki antijenin dağılımı fluoresan mikroskop altında incelemeye tabi tutulur (79).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Deney Hayvanlarının Bakımı

Aynı amaca ulaşmaya yönelik olduğu için filogenetik skalada düşük sırada bulunan deney hayvanının kullanılması prensibine dayanarak çalışmamızda deney hayvanı olarak Wistar-Albino cinsi erkek sıçanlar tercih edildi. Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (FÜDAM) temin edilen deney hayvanlarının sayısının istatistiksel bulguları etkilemeyecek minimum sayılarda olmasına özen gösterildi ve 21 adet, 230-250 gr ağırlığında Wistar-Albino cinsi erkek sıçan çalışmamızın deneysel safhasına dahil edildi. Sabit şekilde 21 °C oda ısısında, doğal ışık döngüsünü algılamaları için 12 saat ışık (7:00-19:00) ve 12 saat karanlıkta (19:00-7:00) tutulan sıçanlar özel olarak yaptırılan otoklavlanabilir yarı şeffaf polipropilen kafeslerde barındırıldı. Albino cinslerinin ışığa olan hassasiyetlerinin kataraktla sonuçlanması bilindiğinden kafeslerin direkt olarak ışığa maruz kalmamasına özen gösterildi. Kafeslerin tabanı parazitlenme riski az olan yonga talaşı ile döşenip, kafes temizliklerinin düzenli yapılması sağlandı. Deney hayvanlarında oluşabilecek stresin deney sonuçlarını etkilemesi söz konusu olduğu için kafesler çalışma süresince mümkün olduğu kadar az gürültülü ortamlarda bekletildi.

Deney süresince hayvanların beslenmelerinde normal çeşme suyu ve çelik kaplarda hazır pellet yem kullanıldı (Tablo 1).

**Tablo 1:** Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi (g/kg).

Buğday	150
Mısır	100
Arpa	270
Kepek	80
Soya	294
Balık Unu	80
Tuz	6
Kavimix VM 23-Z *	2
Methionin	2
DCP **	16

\*1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D<sub>3</sub>, 12 mg E, 0.8 mg K<sub>3</sub>, 0.8 mg B<sub>1</sub>, 2.4 mg B<sub>2</sub>, 1.2 mg B<sub>6</sub>, 0.006 mg B<sub>12</sub> vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3.2 mg Cal. D. Panth., 0.32 mg Folic acid, 0.02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0.8 mg I, 0.2 mg Co, 0.06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.

\*\*%18 fosfor, %25 kalsiyum, %0.2 flor'dan oluşur.

## 2.2. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar

Çalışmada kullanılan sıçanlar üç gruba ayrıldı.

*Grup I Kontrol (Sham-pinealektomi) grubu (n=7):* Bu gruba ait deney hayvanlarının genel anestezi altında tutulması amacıyla rompun (5 mg/kg) ve ketamin (60 mg/kg) karışımı kullanıldı. Pineal bezin bulunduğu bölgedeki kafa derisi ensize edilerek, kafatasında küçük bir pencere açılıp sonra hemen tekrar kapatıldı. Bu cerrahi müdahaleden bir hafta sonra başlanarak üç ay süresince, günlük olarak ve intraperitoneal yolla Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) (% 0.9 NaCl) ile sulandırılmış % 10'luk etanol'den 0.1 ml enjekte edildi.

*Grup II Pinealektomi grubu (n=7):* Bu gruba ait deney hayvanlarının genel anestezisi için de Rompun ve ketamin karışımı kullanılarak sıçanlara cerrahi

pinealektomi yapıldı. Cerrahi müdahaleden yine bir hafta sonra üç ay süresince, her gün intraperitoneal yolla FTS ile sulandırılmış % 10'luk etanol'dan 0.1 ml enjekte edildi.

*Grup III Pinealektomi + Melatonin grubu (n=7):* Cerrahi olarak pinealektomi yapılan bu grubun da genel anesteziye alınması için rompun ve ketamin karışımı uygulandı ve pinealektomi sonrasında bir hafta bekledikten sonra günlük dozu 1 mg/kg olan melatonin, FTS ile sulandırıldı. FTS'de sulandırılmış melatonin, %10'luk 0.1 ml etanol içerisinde intraperitoneal yolla sıçanlara enjekte edildi ve bu uygulama üç ay süreyle günlük olarak gerçekleştirildi

### **2.3. Biyokimyasal Ölçümler**

Biyokimyasal analizlerde incelenecek dokudan farklı olarak bulunan diğer dokular bulguları değiştireceği için alınan hipokampus doku örnekleri öncelikle craniumdan çıkarıldıktan sonra FTS ile hemen ardından soğuk (+4 °C) 0.15 M'lık potasyum klorür (KCl) ile yıkandı ve kurutma kâğıdı ile kurutuldu. Diğer doku ve kan kalıntılarında izole edilen hippocampus dokuları homojenizatör ile (Ultra Turrax Type T25-B, IKA Labortechnik, Germany) 0.15 M'lık KCl çözeltisi içinde 16000 rpm'de 3 dakika süreyle homojen hale getirildi.

Homojenizasyon bir buz kabının içerisinde gerçekleştirildi. Homojenat 5000 rpm hızda 1 saat (+4 °C'de) santrifüjlenerak süpernatant elde edildi ve analiz zamanına kadar (1 hafta) -40 °C'de bekletildi. Elde edilen süpernatanda, oksidatif hasarın bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) değeri, antioksidan enzimlerden olan süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) değerleri spektrofotometrik olarak tayin edildi.

**SOD tayini:** Bu metodun uygulama prensibi süperoksit üreticisi olan ksantin-ksantinoksidaz sisteminin nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgemesi esasına dayanmaktadır. Sun ve ark.'nın modifiye ettiği bu metotla süperoksit dismutaz enzim değerleri belirlendi (84). Çalışmamızda SOD aktivitesi ünite/gram (U/g) doku proteini olarak ifade edildi.

**GSH-Px tayini:** Hidrojen peroksit varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) yükseltgenmesini GSH-Px katalize eder. Glutatyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH-Px'in hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda oluşturduğu GSSG, GSH'a indirgenir. NADPH'ın NADP+'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla GSH-Px aktivitesi hesaplandı ve ünite/gram (U/g) doku proteini şeklinde belirtildi. Çalışmamızda glutatyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve ark.'nın metoduna göre çalışıldı (85).

**MDA tayini:** Malondialdehit, 90-95 °C'de Tiyobarbutirik asit ile reaksiyona girer ve reaksiyon sonucunda rengi pembe olan kromojen oluşmaktadır. 90-95 °C'den on beş dakika sonra hızla soğutulan numuneler, spektrofotometrik olarak absorbanslarının 532 nm'de okunmasıyla sonuçlar elde edildi. MDA değerlerinin tespiti lipid peroksidasyon ölçüm metodu olan Esterbauer metodu uygulanarak yapıldı (86). Sonuçlar nanomol/gram (nmol/g) doku proteini olarak ifade edildi.

#### **2.4. Histolojik Uygulamalar**

Mikroskopik incelemeler için alınan hipokampus doku örnekleri tespit işlemine geçilmeden önce hipokampus dokusuna yapışmış olan kan veya yabancı dokuların uzaklaştırılması amacıyla enjektöre çekilmiş FTS ile kısa süreyle yıkandı. Hipokampus dokusunun tespiti için %10'luk formaldehit solüsyonu, formaldehitin %37'lik ticari hali kullanılarak seyreltilip hazırlandı. Doku örnekleri çalışmaya

uygun düşecek şekilde daha küçük parçalara ayrıldı. Elde edilen doku parçaları, hangi çalışma grubuna ait olduğunu belirten etiketlerle birlikte paketlenerek çeşme suyunda yıkandıktan sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirilerek parafine gömüldü (Tablo 2). Çeşme suyunda yıkama aşamasında dokuya zarar vermemek için akarsu yerine durgun suda bekletme yoluyla yıkama yapıldı.

**Tablo 2:** Histolojik takip serileri.

Sıra No	Kullanılan Madde	Kimyasal Bekletilme Süresi
1	%70 Alkol	2 saat
2	%80 Alkol	1.5 saat
3	%96 Alkol I	30 dakika
4	%96 Alkol II	30 dakika
5	%100 Alkol I	30 dakika
6	%100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	30 dakika
9	Xylol II	30 dakika
10	Yumuşak Parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak Parafin	1 saat
12	Y. Parafin + Sert Parafin	1.5 saat
13	Sert Parafin	3 saat

## 2.5. İmmunohistokimyasal Boyama

Parafin bloklardan mikrotomla alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler elde edildi. Kesitler, poly-lysine ile kaplı lamalar üzerine yerleştirildi. Daha sonra dokular lamalar üzerinde immunohistokimyasal metotlar kullanılarak boyandı. İmmunohistokimyasal boyama Avidinbiyotin- peroksidaz yöntemi (*ABC Metodu*) ile gerçekleştirildi.

Primer antikor olarak Bax monoklonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology U.S.) kullanıldı (Tablo 3).

**Tablo 3:** İmmünohistokimyasal boyama prosedürleri.

Sıra	İşlem	Süresi
1	Deparafinizasyon	1 saat
2	Distile su	5 dakika
3	Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS)'de (pH: 7.6)	5 dakika
4	%3'lük H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'de	5 dakika
5	PBS'de (pH: 7.6)	5 dakika
6	Primer antikor (Bax) –oda ısısında	30 dakika
7	PBS'de (pH: 7.6)	5 dakika
8	Sekonder antikor	30 dakika
9	PBS'de (pH: 7.6)	5 dakika
10	Streptavidin peroksidaz	30 dakika
11	PBS'de (pH: 7.6)	5 dakika
12	AEC Kromojen	10 dakika
13	Distile su	5 dakika
14	Zıt boya olarak Mayer's hematoksilen	1 dakika
15	Akarsuda	1 dakika
16	Kurulama	
17	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

Tabloda sıralanan immunohistokimyasal boyama protokolüne göre boyanan hipokampus doku kesitleri, Olympus BX50 araştırma mikroskobu ile değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak hücre sitoplazmalarında gözlenen Bax boyanmasının şiddeti 0'dan +5'e kadar semikantitatif olarak derecelendirildi (Tablo 4).

**Tablo 4:** İmmünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun derecelendirilmesi.

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Minimal
+2	Az
+3	Orta
+4	Çok
+5	Şiddetli

## 2.6. İstatistiksel Analiz

“SPSS 15.0 for windows” istatistik programı ile piknotik hücre sayılarının ve biyokimyasal parametrelerin (SOD, GSH-Px, MDA) sonuçları analiz edildi. Grupların değerleri “*Kruskal-Wallis Varyans Analizi*” ile karşılaştırıldı. “*Mann-Whitney U Testi*” ise farkın hangi grup/gruplardan kaynaklandığını bulmak için uygulandı. İstatistiksel olarak bulguların anlamlı değerler ifade edebilmesi için  $p < 0.05$  kriteri kullanıldı. Elde edilen veriler aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata (SH) şeklinde tabloya aktarıldı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Biyokimyasal Bulgular

Deneysel olarak gerçekleştirdiğimiz bu araştırmada, antioksidan savunma sisteminin üyelerinden olan SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak belirlendi. Ayrıca, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ve dokudaki oksidatif hasarın ortaya konmasında önemli bir parametre olarak kullanılan MDA düzeyleri de yine aynı yöntemle ölçüldü.

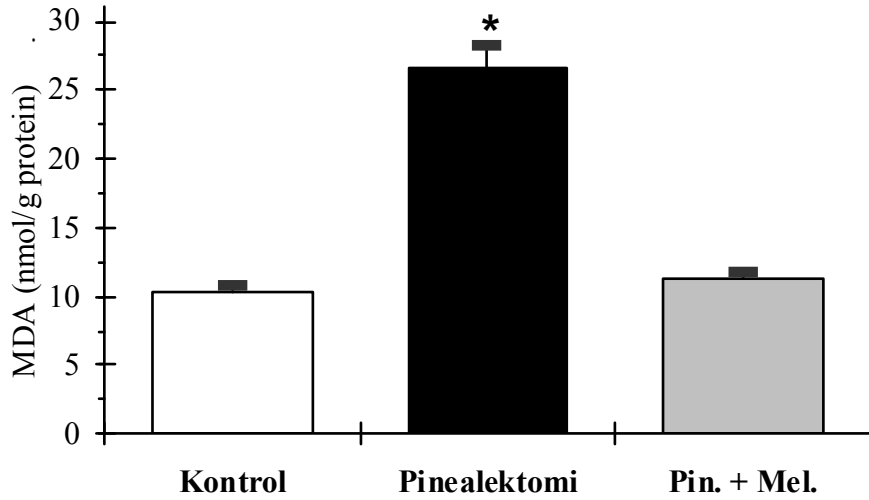
Pinealektomi yapılan sıçanlarda, hipokampus dokusuna ait SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinin kontrol grubuna ait değerler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olduğu tespit edildi ( $p<0.05$ ). Diğer taraftan, pinealektomi sonucu hipokampus MDA seviyelerinin ise yine kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ( $p<0.05$ ) (Tablo 5, Şekil 9, 10, 11).

Pinealektomi sonrası melatonin hormonu uygulanan hayvanlara ait biyokimyasal değerler incelendiğinde ise, hipokampus SOD ve GSH-Px enzim değerlerinin yükseldiği, MDA seviyelerinin de düştüğu belirlendi ( $p<0.05$ ) (Tablo 5, Şekil 9, 10, 11).

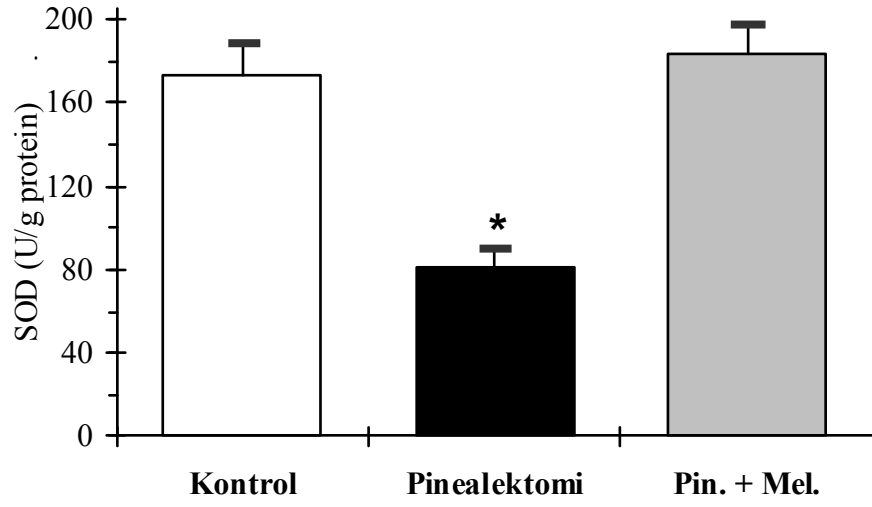
**Tablo 5.** Gruplara ait hipokampus doku örneklerindeki SOD, GSH-Px ve MDA değerleri (n=7).

PARAMETRE	KONTROL	PİNEALEKTOMİ	PİNEALEKTOMİ+ MELATONİN
SOD (U/g protein)	173,41 ± 15,13	81,63 ± 8,76*	184,32 ± 13,70
GSH-Px (U/g protein)	97,94 ± 5,42	38,99 ± 5,69*	103,28 ± 6,23
MDA (nmol/g protein)	10,36 ± 0,56	26,62 ± 1,77*	11,28 ± 0,52

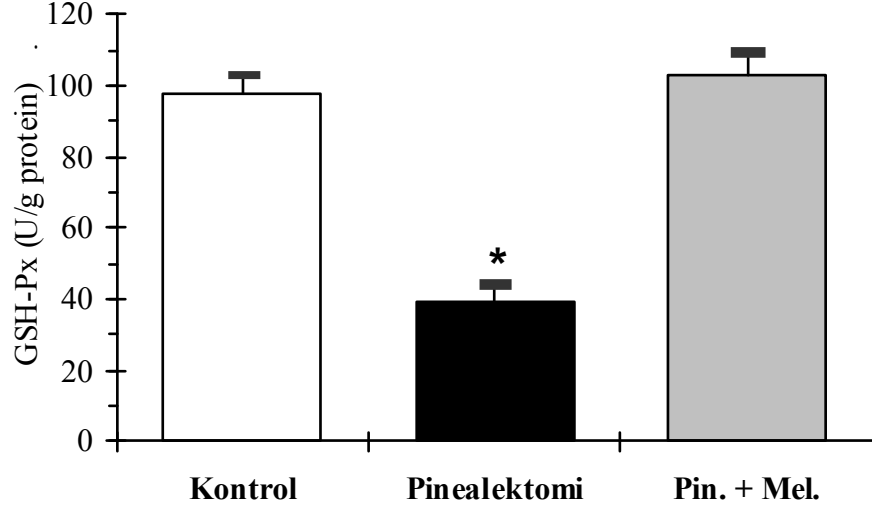
Değerler ortalama ± SH şeklinde verilmiştir. \*p<0.01 (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).



**Şekil 9.** Deney gruplarına ait MDA değerleri (nmol/g protein). \*p<0.01 (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).



**Şekil 10.** Deney gruplarına ait SOD değerleri (U/g protein). \* $p < 0.01$  (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).



**Şekil 11.** Deney gruplarına ait GSH-Px değerleri (U/g protein). \* $p < 0.01$  (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).

## **3.2. Histolojik Sonuçlar**

### **3.2.1 Işık Mikroskopik Bulgular**

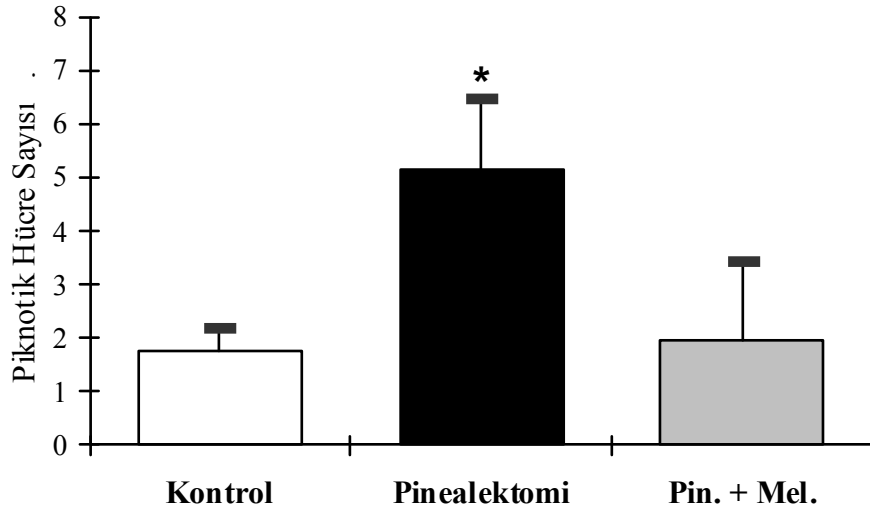
Gruplara ait hipokampus doku kesitleri rutin Hematoksilen-Eosin (H.E) ile boyanarak incelendi. Bu incelemede, hipokampus'un piramidal hücre tabakası 40'lık büyütmede eyepieces graticule alanında gözden geçirildi ve bu alana düşen piknotik hücre sayılarının aritmetik ortalamaları elde edildi. Bu işlemler sonucunda, pinealektomi sonrası hipokampus doku örneklerindeki piknotik hücre sayısının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olduğu tespit edildi. Pinealektomi sonrası melatonin hormonu enjekte edilen sıçanlarda ise, hipokampus piknotik hücre sayısının pinealektomi grubuna göre azaldığı görüldü (p<0.05) (Tablo 6, şekil 12, 13, 14).

Bunun yanı sıra, işık mikroskopik gözlemlerimizde kontrol sıçanlarına ait hipokampus dokusunun normal olduğu gözlendi (şekil 15, 16). Pinealektomi sonrası hipokampus histolojik yapısında ise vakuoler dejenerasyonun meydana geldiği tespit edildi (şekil 17, 18, 19). Pinealektomi sonrası melatonin uygulanan sıçanlarda da, pinealektomi sonucu oluşan vakuoler dejenerasyonun kaybolduğu ve doku görünümünün kontrol grubuna benzediği görüldü (şekil 20, 21).

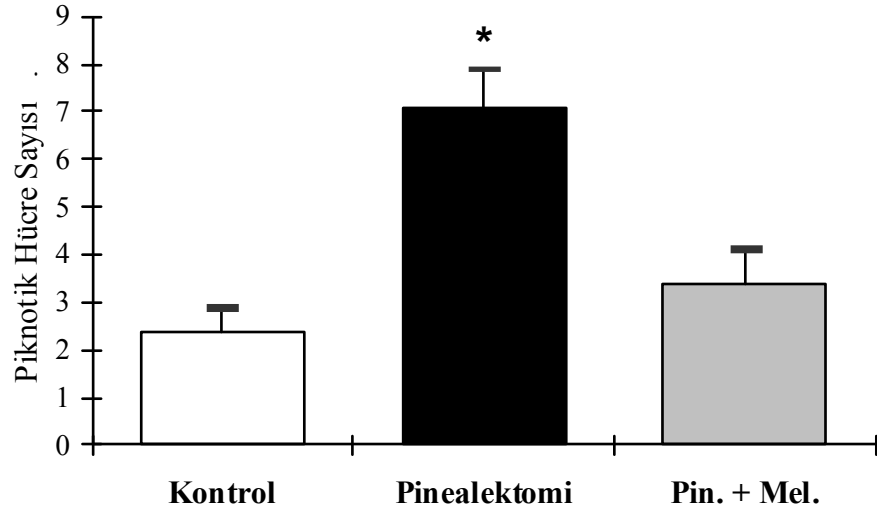
**Tablo 6.** Gruplara ait hipokampus CA1, CA2 ve CA3 alanlarını içeren piramidal hücre tabakasına ait piknotik hücre sayıları (n=7).

ALANLAR	KONTROL	PİNEALEKTOMİ	PİNEALEKTOMİ+ MELATONİN
CA1	1,76 ± 0,44	5,16 ± 1,32*	1,98 ± 1,46
CA2	2,36 ± 0,53	7,08 ± 0,81*	3,41 ± 0,72
CA3	1,29 ± 0,64	4,28 ± 1,02*	2,04 ± 0,60

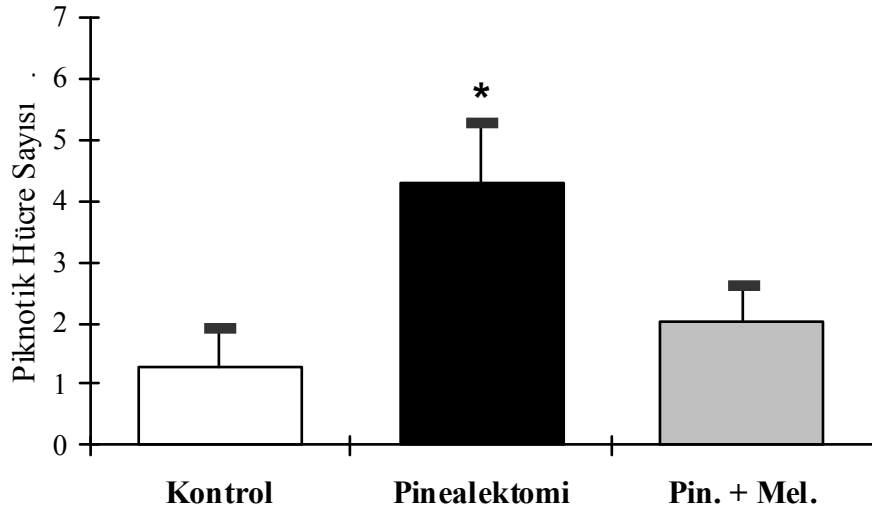
Değerler ortalama ± SH şeklinde verilmiştir. \*p<0.01 (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).



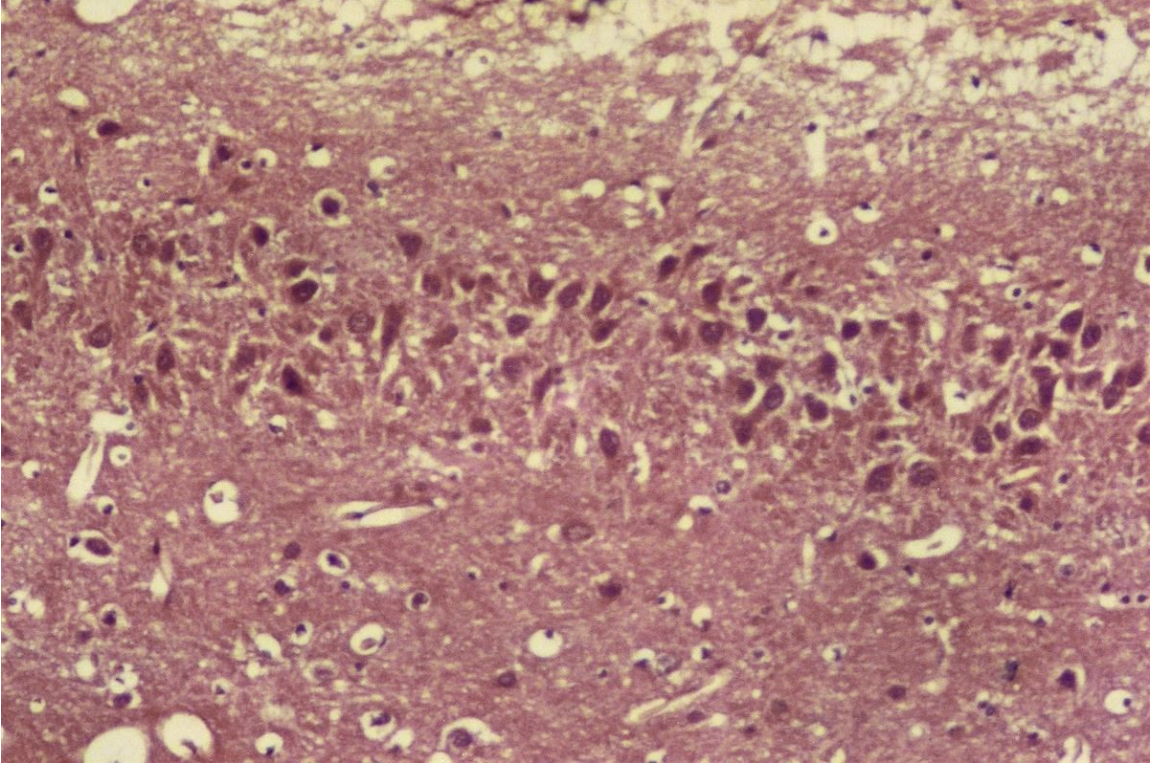
**Şekil 12.** Deney gruplarına ait hipokampus CA1 alanında bulunan piknotik hücre sayısı. \*p<0.05 (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).



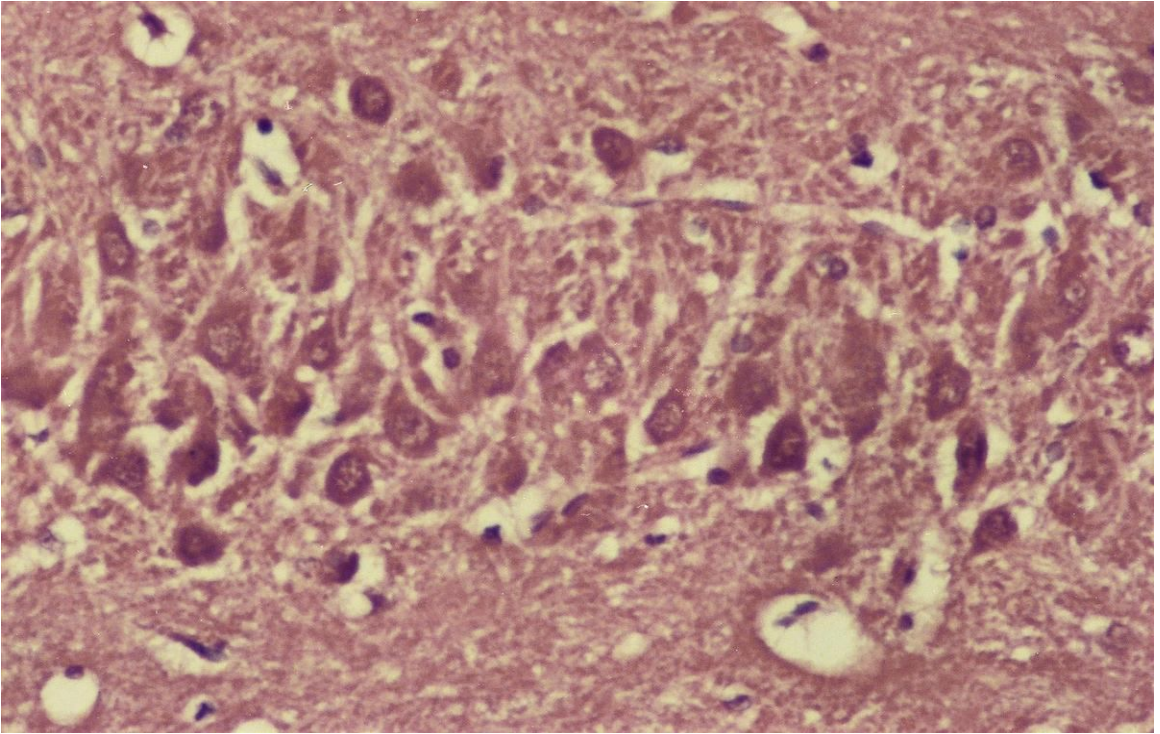
**Şekil 13.** Deney gruplarına ait hipokampus CA2 alanında bulunan piknotik hücre sayısı. \* $p < 0.05$  (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).



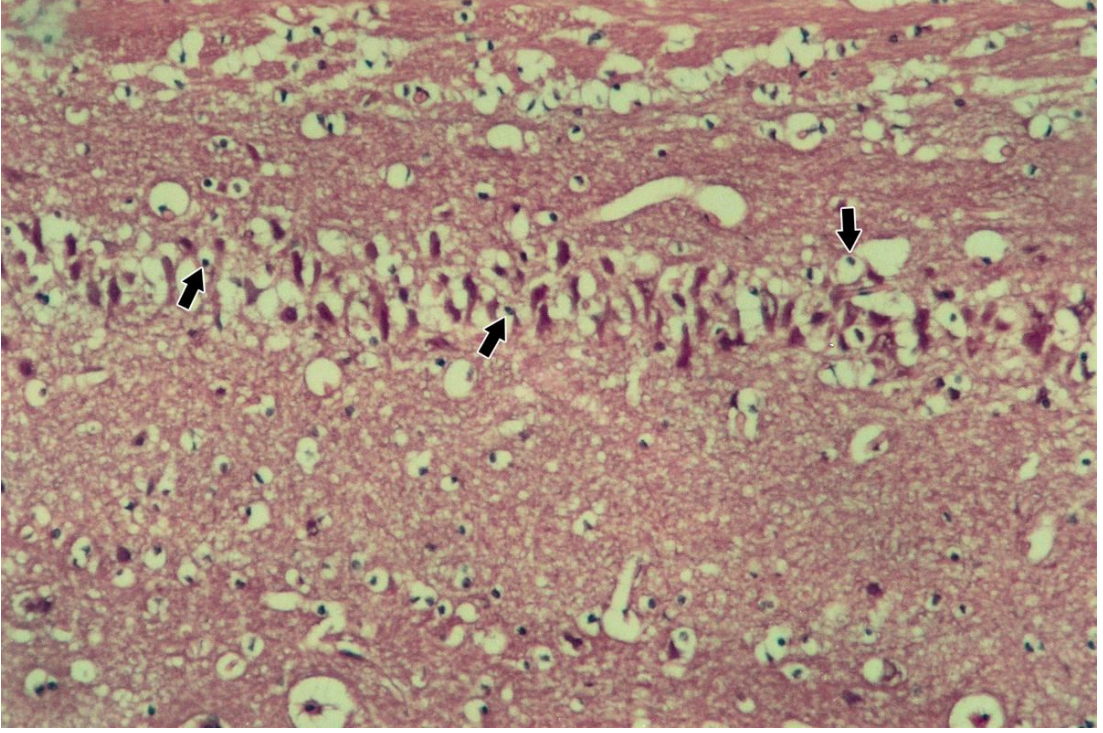
**Şekil 14.** Deney gruplarına ait hipokampus CA3 alanında bulunan piknotik hücre sayısı. \* $p < 0.05$  (Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında).



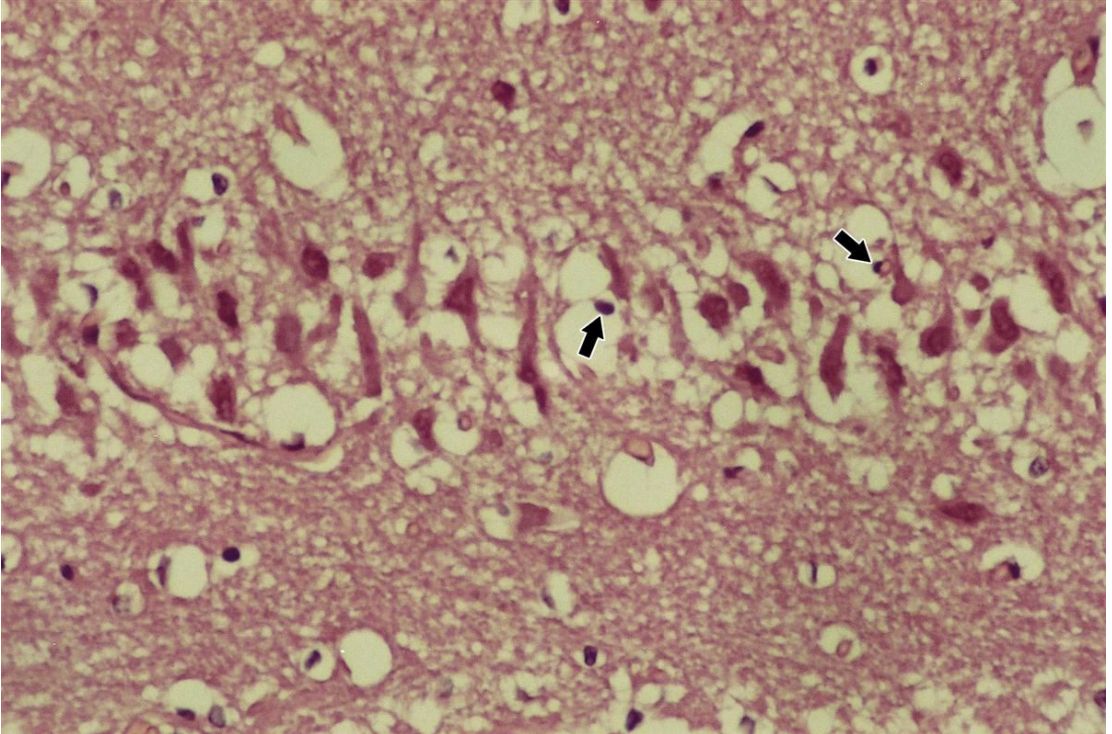
**Şekil 15:** Kontrol grubuna ait hipokampus histolojik yapısının normal görünümü. H.E X20.



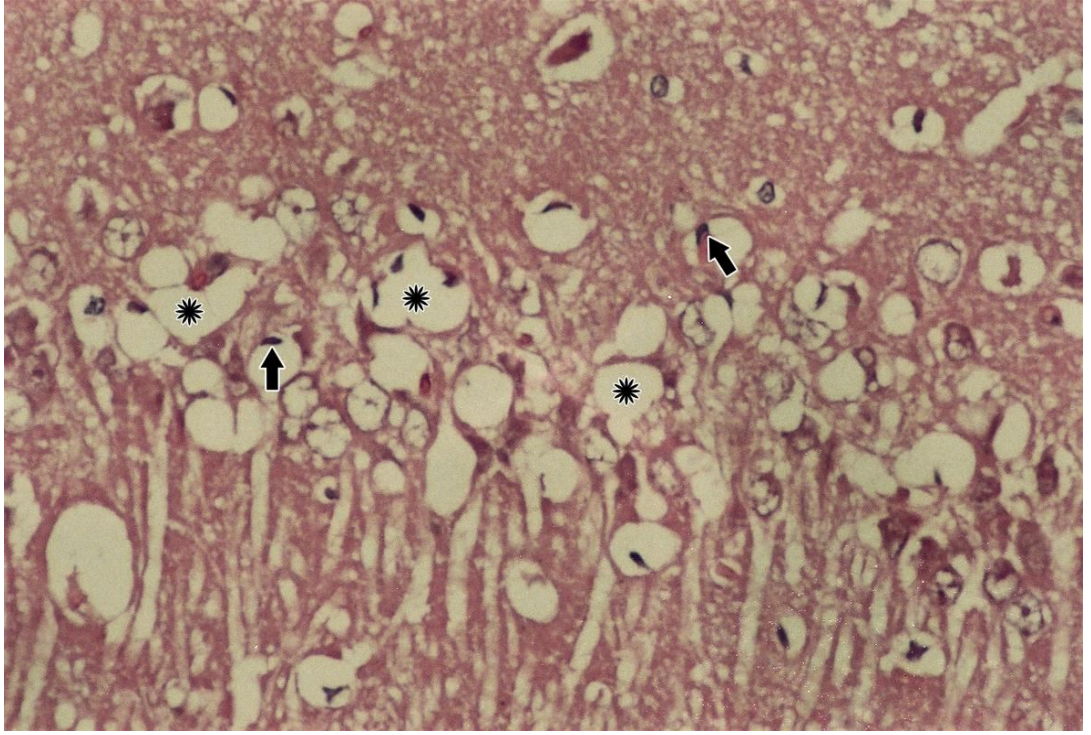
**Şekil 16:** Kontrol sıçanlarına ait hipkampus mikroskopik yapısı. H.E X40.



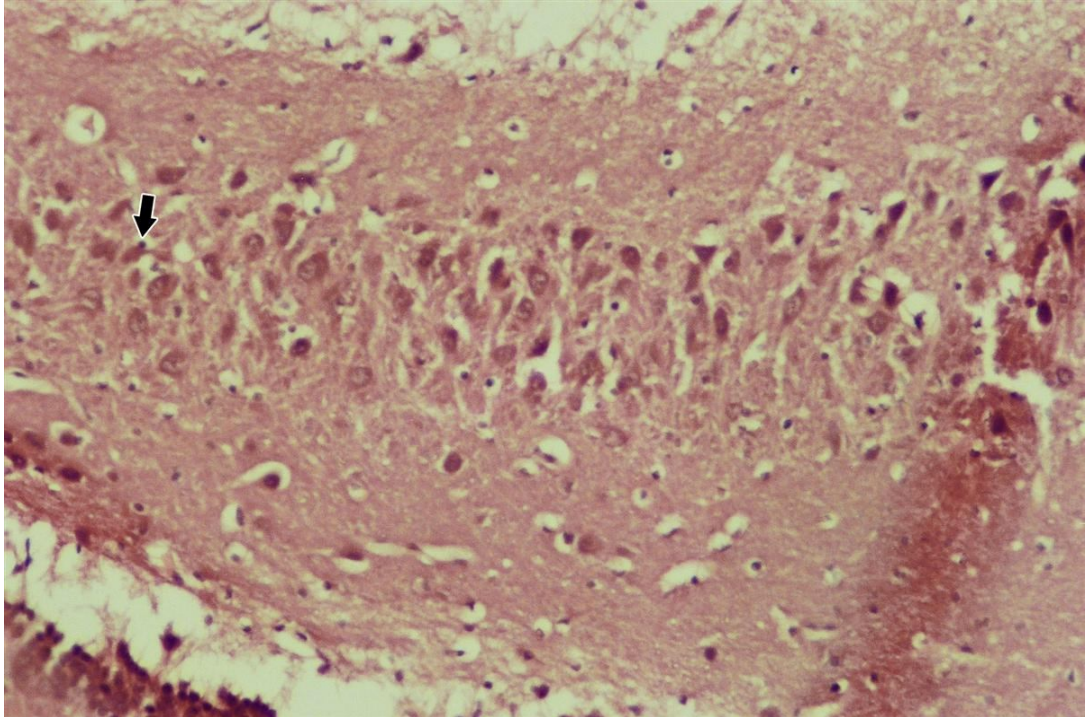
**Şekil 17:** Pinealektomili hayvanlara ait hipokampus'un histolojik yapısı incelendiğinde yoğun bir şekilde piknotik hücrelerin (ok) varlığı dikkati çekmekte. H.E X20.



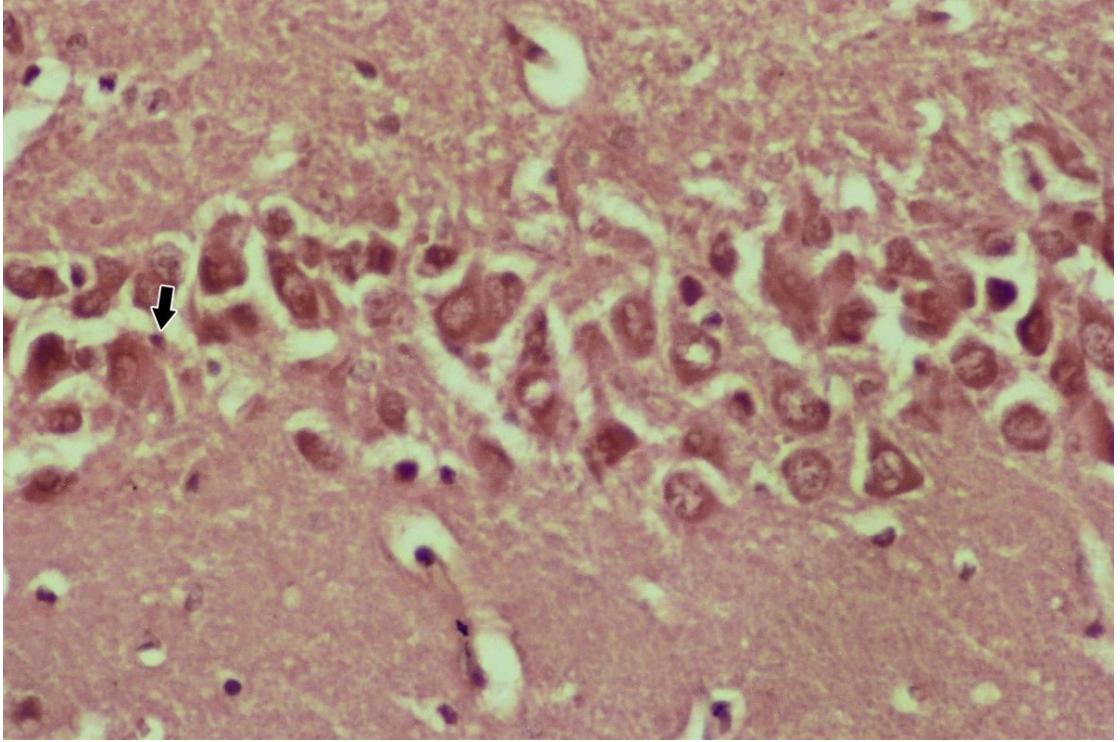
**Şekil 18:** Pinealektomi sonrası hipokampus'ta gözlenen piknotik (ok) izlenmekte. H.E X40.



**Şekil 19:** Pinealektomi sonucu hipokampus histolojik yapısında piknotik hücreler (ok) ile birlikte vakuoler dejenerasyonun olduğu (yıldız) gözlenmekte. H.E X40.



**Şekil 20:** Pinealektomi sonrası melatonin uygulanan sıçanlara ait hipokampus yapısı incelendiğinde, piknotik hücrelerin (ok) azaldığı ve doku görünümünün kontrol grubuna benzediği dikkati çekmekte. H.E X20



**Şekil 21:** Pinealektomi sonrası melatonin enjekte edilen gruba ait hipokampus'ta çok az miktarda piknotik hücreler (ok) gözlenmekte. H.E X40.

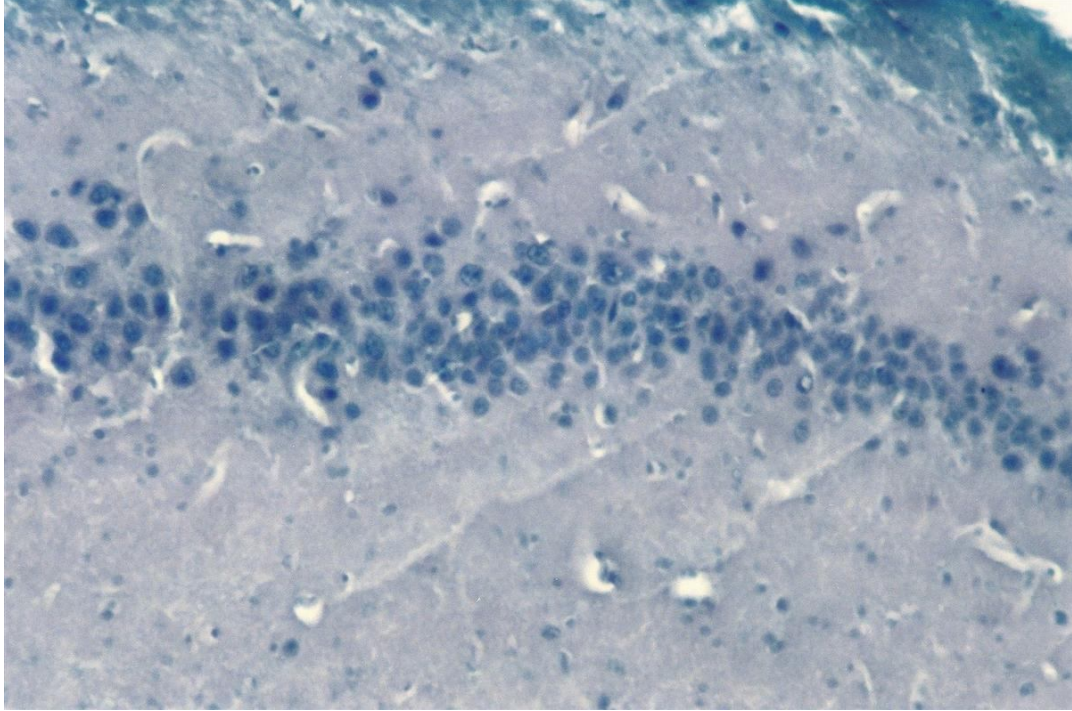
### 3.2.2 İmmunohistokimyasal Bulgular

Araştırmamızın bu bölümünde, gruplara ait hipokampus doku örneklerinde apoptozisin varlığını ortaya koyabilmek için immunohistokimyasal metotlarla Bax boyaması gerçekleştirildi. Dokudaki Bax proteininin görünür hale getirilmesi esasına dayanan bu yöntemde, saptanan boyanma reaksiyonun yoğunluğuna göre değerlendirme yapıldı.

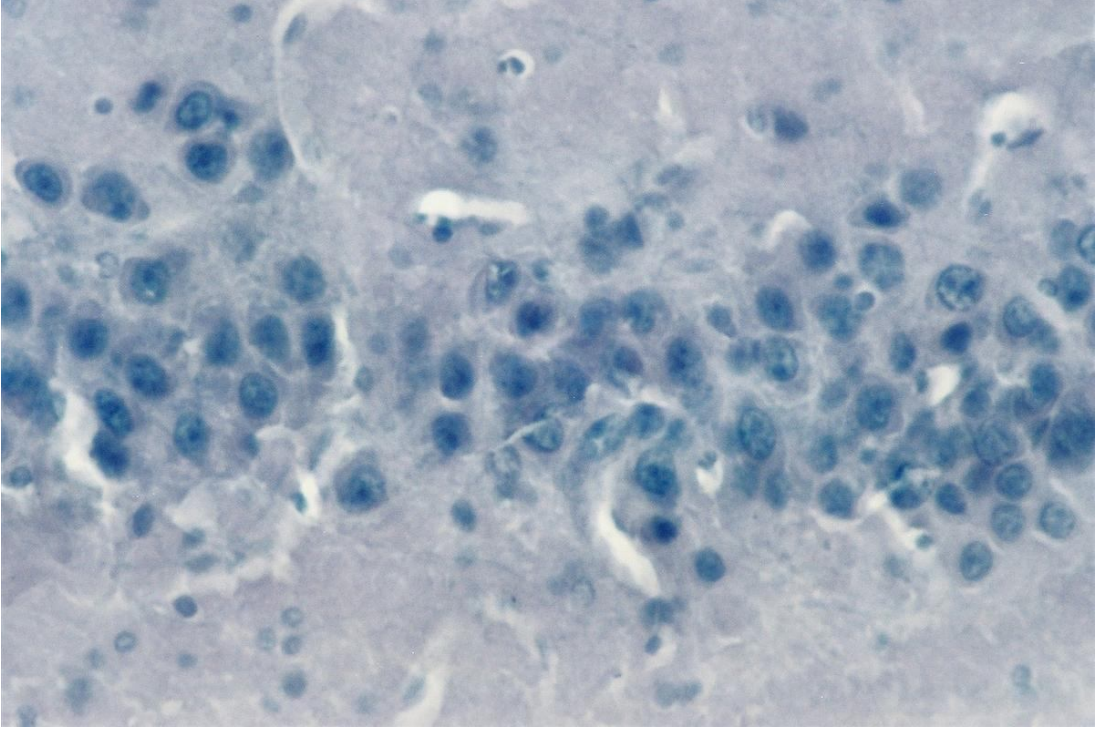
Kontrol grubu sıçanlarına ait doku kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, hipokampus'ta Bax boyanma reaksiyonunun olmadığı (0) görüldü (Şekil 22, 23). Pinealektomili hayvanlara ait hipokampus kesitlerinde ise, hücre sitoplazmalarında şiddetli derecede Bax boyanmasının olduğu (+5) immunohistokimyasal olarak tespit edildi (Şekil 24, 25). Pinealektomiye takiben

melatonin uygulanan sıçanlarda da, hipokampus histolojik yapısında herhangi bir immunhistokimyasal Bax boyanmasının meydana gelmediği gözlemlendi (Şekil 26, 27).

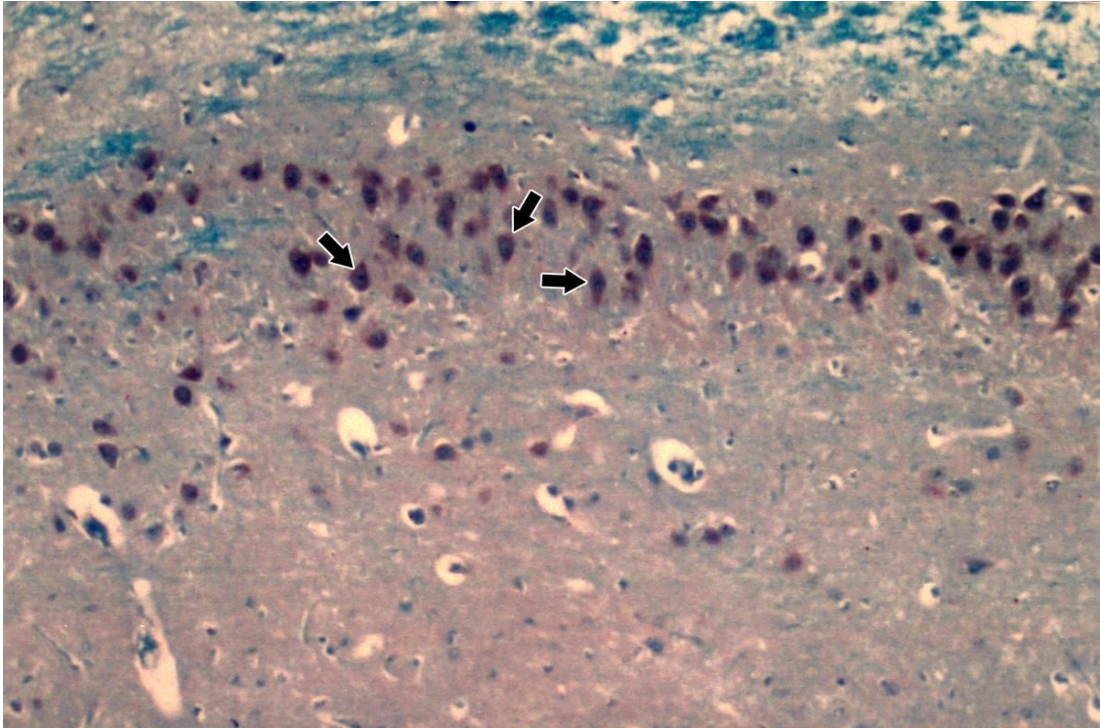
Araştırmamızın biyokimyasal ve mikroskopik bulguları, pinealektomi sonucu hipokampus antioksidan savunma sisteminin bozulduğunu ve dokuda oksidatif hasarla birlikte apoptozisin meydana geldiğini ortaya koymuştur. Bunun yanı sıra, pinealektomi sonucu oluşan oksidatif doku hasarının ve apoptotik değişikliklerin melatonin enjeksiyonuyla önlenmediği tespit edilmiştir.



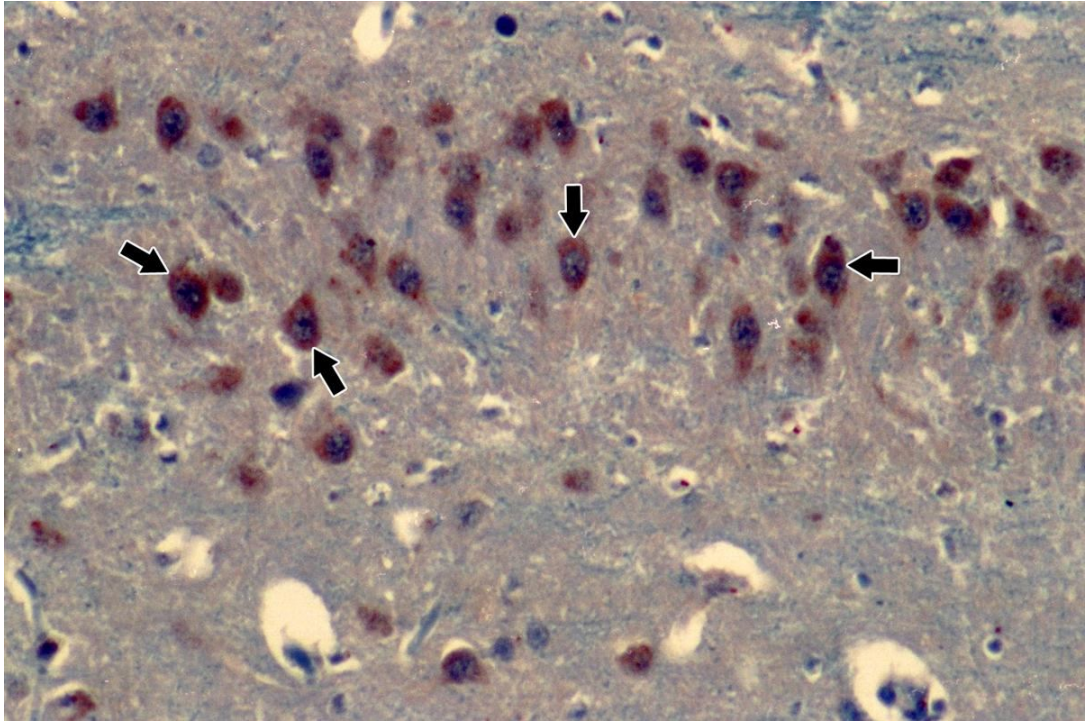
**Şekil 22:** Kontrol grubuna ait hipokampus yapısında immunohistokimyasal olarak Bax boyanmasının olmadığı gözlenmektedir. X20.



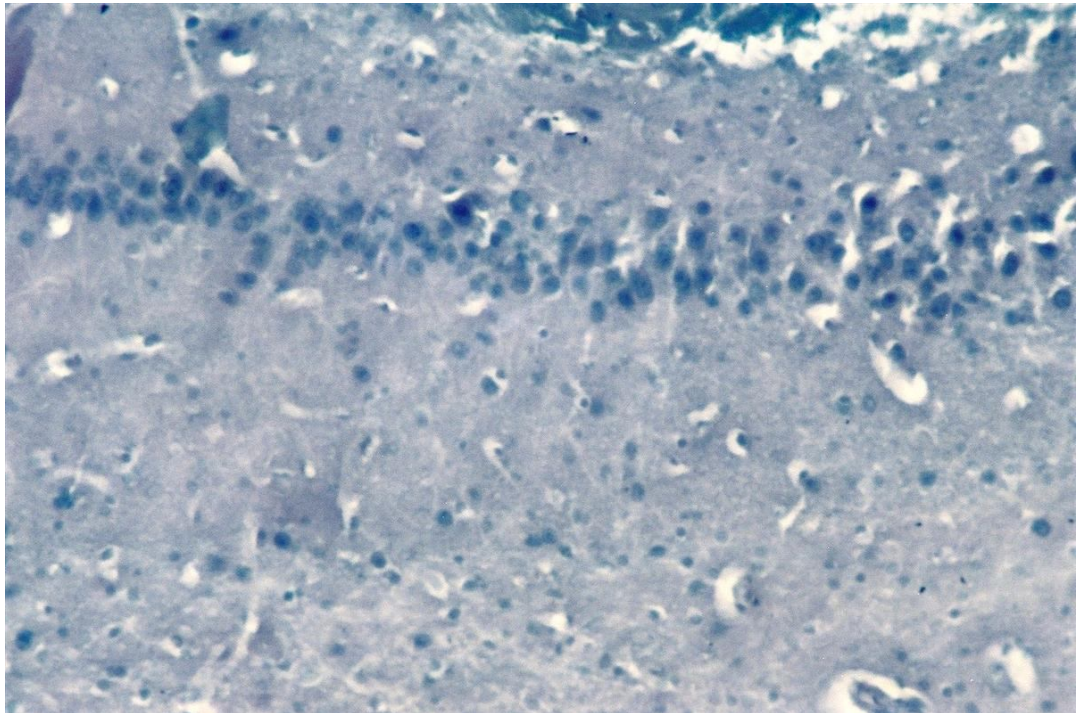
**Şekil 23:** Kontrol sıçanlarına ait hipokampus kesitlerinde negatif Bax boyanması görülmekte.  
X40



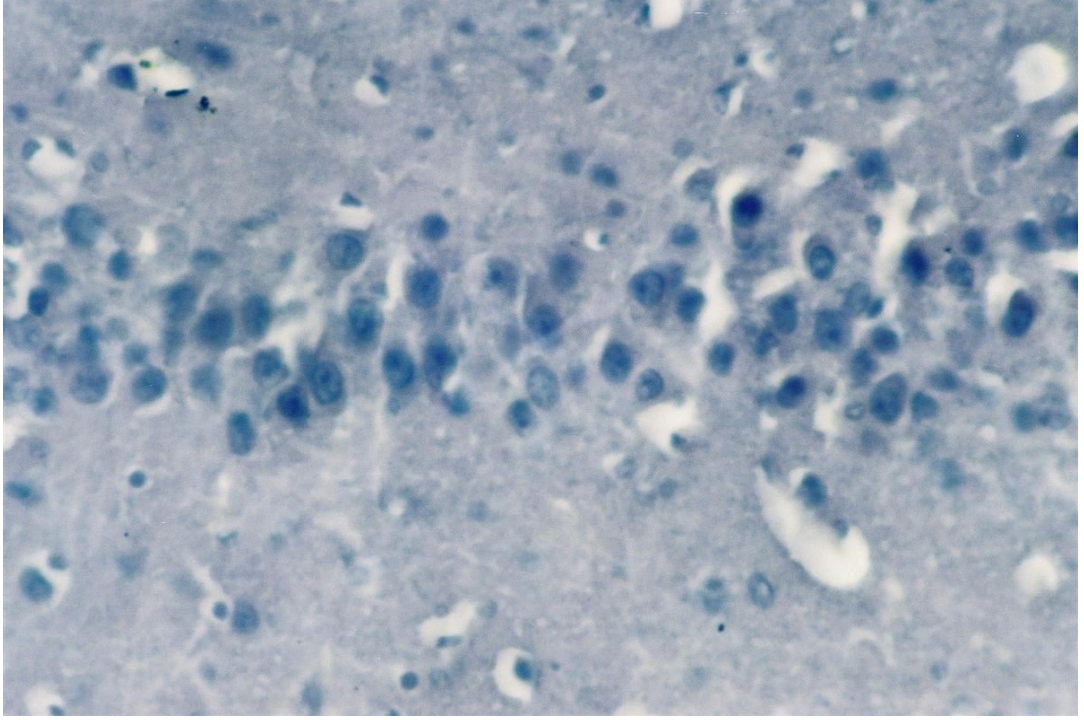
**Şekil 24:** Pinealektomi sonrası hipokampus dokusu incelendiğinde, immunohistokimyasal olarak şiddetli derecede Bax boyanmasının (ok) olduğu dikkati çekmekte. X20.



**Şekil 25:** Pinealektomi sonucu hipokampus'ta gözlenen Bax boyanmasının şiddetli derecede olduğu görülmekte. X40.



**Şekil 26:** Pinealektomi sonrası melatonin uygulanan sıçanlara ait hipokampus yapısında immunohistokimyasal olarak Bax boyanma reaksiyonunun negatif olduğu dikkati çekmekte. X20.



**Şekil 27:** Pinealektomi ile birlikte melatonin enjekte edilen gruba ait hipokampus histolojik yapısının görünümü. İmmnuohistokimyasal olarak herhangi bir Bax boyanmasının mevcut olmadığı izlenmekte. X40.

## TARTIŞMA

Deneysel olarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, pinealektomili sıçanlara ait hipokampus yapısı biyokimyasal ve mikroskopik düzeylerde araştırılmıştır. Ayrıca, pinealektomi sonrası melatonin hormonu uygulanmış hayvanlarda da hipokampus aynı yöntemler kullanılarak incelenmiştir.

Organizma bünyesinde, herhangi bir patolojik olay sonucunda ya da normal fizyolojik süreçte oluşan serbest radikaller ile bunların koruyucusu olan antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin serbest radikaller lehine kayması oksidatif stresin meydana geldiğini gösterir. Canlı, kendini oksidatif hasara karşı enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistem ve moleküllerle korumaktadır. Hücre seviyesinde etkili olan enzimatik antioksidan sistemler içerisinde süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) yer alır (87).

Yapmış olduğumuz bu araştırmada, pinealektomi sonrası hipokampus doku örneklerine ait SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. SOD ve GSH-Px enzimlerindeki bu azalma, dokudaki antioksidan savunma mekanizmasının pinealektomi sonucu bozulduğunu ortaya koymaktadır. Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biridir ve oksidatif hasarı göstermede yaygın olarak kullanılan bir parametredir (88). Çalışmamızda da, pinealektomi yapılan sıçanlarda MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür. MDA düzeyindeki bu artış, pinealektominin hipokampusta lipid peroksidasyonuna ve doğal olarak oksidatif hasara yol açtığını ifade etmektedir

Delibaş ve ark. (89), sıçanlar üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında, fonksiyonel pinealektomi sonrası beyin dokularında SOD enzim aktivitesinin

azaldığını, MDA düzeylerinin ise arttığını bildirmişlerdir. Ateş ve ark. (90), yine deneysel olarak yaptıkları çalışmalarında pinealektomi sonucu hipokampusta oksidatif hasarın meydana geldiğini ve doku MDA düzeylerinin yükseldiğini ifade etmişlerdir. Benzer şekilde Reiter ve ark. (91) da sıçanlarda pinealektomi sonucu hipokampusta lipid peroksidasyonunun meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Ayrıca, yapılan diğer araştırmalarda pinealektomi sonrası nöral dokularda antioksidan savunma sisteminin bozulduğu ifade edilmiştir (92, 93). Yapmış olduğumuz bu çalışmanın biyokimyasal verileri, pinealektominin hipokampusta oksidatif hasar oluşturması yönüyle yukarıdaki araştırmalarla (89-91) uyum göstermektedir

Yine daha önce deneysel olarak yapılmış olan araştırmalarda, pinealektominin hipokampus mikroskobik yapısında da değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir. De Butte ve Pappas (93) erkek sıçanlar üzerinde yapmış oldukları benzer çalışmalarda, pinealektomi sonrası hipokampus CA1 ve CA3 bölgelerindeki pyramidal hücrelerde dejenerasyon ile birlikte pyramidal hücre sayılarının da azaldığını göstermişlerdir. Turgut ve ark. (92) ise pinealektomili sıçanlarda hipokampus yapısındaki hücrelerde apoptotik değişikliklerin meydana geldiğini ifade etmişlerdir. Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmamızın ışık mikroskobik incelemelerinde ise, pinealektomi sonrası hipokampus doku örneklerindeki piknotik hücre sayısının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi. Ayrıca, pinealektomi sonrası hipokampus histolojik yapısında vakuoler dejenerasyonun meydana geldiği görülmüştür. Pinealektomi sonrası hipokampusta meydana gelen mikroskobik değişiklikler yönüyle araştırmamız daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. Ancak,

pinealektomi sonrası yani melatonin sentezinin olmadığı durumda, hipokampus dokusunda oluşabilecek apoptotik değişiklikler ile ilgili herhangi bir immunohistokimyasal çalışmaya rastlanmadı. Yapmış olduğumuz bu çalışmada ise, pinealektomi sonrası hipokampusta meydana gelen apoptozis immunohistokimyasal olarak ortaya kondu.

Pineal bez tarafından sirkadiyan ritimde ve karanlıkta salgılanan melatonin hormonu, başta endokrin sistemin düzenlenmesi olmak üzere, gonadal fonksiyonların baskılanması, bağışıklık sisteminin kuvvetlendirilmesi ve düz kas tonusunun regülasyonu gibi birçok fizyolojik işlevlerde görev alır (94-99). Ayrıca, bu hormonun güçlü bir antioksidan olduğu (100-103) ve dokularda lipid peroksidasyon sonucu oluşan oksidatif hasarı önlediği son yıllarda yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (104-106). Hem yağda hem de suda çözünebilir nitelikte olduğu için, nükleus dahil hücrenin her organeline ulaşabilir. Bu özellik, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, melatonine bir üstünlük sağlamaktadır (94, 95). Bunun yanı sıra, kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilen, dolayısıyla beyin dokularında da antioksidan özelliğini gösteren bir hormondur (107, 108). Melatonin güçlü antioksidan etkisinin yanı sıra, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini de stimüle eder (107). Sinir sistemine ait dokular üzerinde yapılan araştırmalarda da melatoninin antioksidan özelliği vurgulanmış ve melatonin hormonunun oksidatif strese bağlı olarak oluşan nöronal hasara karşı koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir (107-113). Kabuto ve ark. (109) sıçanlar üzerinde yapmış oldukları in vitro çalışmalarında, beyin korteksinde demirle indüklenmiş oksidatif hasarın melatonin uygulaması ile engellendiğini tespit etmişlerdir.

Mason ve ark. (111) ise, sıçan beyincisindeki granuloza hücrelerinde oksidatif strese bağlı olarak oluşan apoptozisin melatonin uygulaması ile inhibe olduğunu ifade etmişlerdir. Skaper ve ark. (108) da, yaşlanmaya bağlı olarak meydana gelen nöronal hasarın melatonin ile engellendiğini göstermişlerdir. Yine sıçanlar üzerinde deneysel olarak yapılan başka bir araştırmada, beyin korteksinde gama-radyasyona bağlı olarak gelişen MDA düzeylerindeki artışın, melatonin uygulaması ile azaldığını ve lipid peroksidasyonun engellendiği gösterilmiştir (113). Benzer şekilde, sıçanlarda formaldehit maruziyeti sonucu prefrontal kortekste oluşan oksidatif doku hasarının melatonin enjeksiyonu ile gerilediği bildirilmiştir (114,115). Melatonin hormonunun hipokampus üzerinde de koruyucu etki gösterdiği yapılan deneysel araştırmalarda ortaya konmuştur (116,117). De Butte ve Pappas (93), sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında, pinealektomi sonucu hipokampus CA1 ve CA3 alanlarında oluşan pyramidal hücre kayıplarının melatonin enjeksiyonu ile giderildiğini göstermişlerdir.

Özdemir ve ark. (118), sıçanlarda deneysel olarak oluşturdukları hipokampus hasarının melatonin tedavisiyle gerilediğini ifade etmişlerdir. Sıçanlar üzerinde yapılmış olan diğer bir çalışmada da, etanol maruziyeti sonucu hipokampus SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerindeki azalmanın melatonin uygulamasıyla yükseldiği tespit edilmiştir. Kuş ve ark. (119) ise sıçan hipokampusunda formaldehit maruziyeti sonucu azalmış olan SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinin melatonin tarafından yükseltildiğini, yine formaldehit maruziyeti sonucu artmış olan doku MDA düzeylerinin ise bu hormon tarafından düşürüldüğünü bildirmişlerdir. Benzer şekilde, sıçanlarda homosistein maruziyeti ile hipkampusu oluşturulan apoptozisin melatonin enjeksiyonu ile önlendiğini ortaya konulmuştur. Ayrıca sıçanlarda siyanik asit

toksitesisi ile hipokampusta oluşturulan nöronal hasarın ve piknotik hücre artışının melatonin ile engellendiği bildirilmiştir (120).

Yapmış olduğumuz bu araştırmada da, pinealektomi sonrası melatonin hormonu uygulanan hayvanlara ait hipokampus SOD ve GSH-Px enzim değerlerinin yükseldiği, MDA seviyelerinin de düştüğü belirlendi. Bu bağlamda, hipokampusta pinealektomi sonucu oluşan oksidatif doku hasarının melatonin tarafından önlendiği biyokimyasal düzeyde görüldü. Ayrıca, melatonin verilen sıçanlarda, pinealektomi sonrası hipokampusta görülen piknotik hücre artışının gerilediği ve vakuoler doku dejenerasyonunun kaybolduğu tespit edildi. İmmunohistokimyasal olarak da, pinealektomi sonucu hipokampusta oluşan apoptozisin melatonin tarafından önlendiği ortaya kondu. Melatonin hormonunun nöroprotektif etkinliği yönüyle baktığımızda, çalışmamızın biyokimyasal ve mikroskopik bulguları daha önce yapılmış olan araştırmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Biyokimyasal, ışık mikroskopik ve immunohistokimyasal olarak sıçanlar üzerinde gerçekleştirdiğimiz bu araştırma sonucunda, pinealektominin hipokampus antioksidan savunma mekanizmasını zayıflattığı ve dokuda oksidatif hasara neden olduğu tespit edildi. Bunun yanı sıra, pinealektomi işlemi sonucu hipokampus histolojik yapısının bozulduğu ve apoptozisin meydana geldiği görülmüştür. Ayrıca, pinealektomiye bağlı olarak hipokampusta oluşan oksidatif doku hasarının, mikroskopik değişikliklerin ve de apoptozisin melatonin uygulamasıyla baskılandığı ve gerilediği ortaya kondu.

## 5. KAYNAKLAR

1. Barr ML, Klernam JA. The Human Nervous System. 5th edition. Philadelphia: JB Lippincott Comp, 1988: 266-9.
2. Songur A. Sıçanlarda Solunan Formaldehitin Postnatal Gelişim Sürecinde Formatio Hippocampi Üzerine Etkilerinin Morfolojik Olarak İncelenmesi. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi Anabilimdalı, 2001.
3. Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. Hipokampus. T Klin Tıp Bilimleri 2001:21:427-31.
4. Aktan ZA. Limbik sistem. Sendrom 1997:9:65-9.
5. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. Başaklar C (Çeviren) s.262-356, Ankara, Palme Yayıncılık, 1993.
6. Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human. 6th edition, Philadelphia: WB Saunders Company, 1998: 477.
7. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. Baskı (2. Cilt), Ankara: Güneş Kitabevi, 2001: 318-93.
8. Carpenter MB, Sutin J. Human Neuroanatomy. 8th edition, Baltimore: Williams & Wilkins Pres, 1983: 237.
9. Nolte J. The Human Brain: An Introduction to Its Functional Anatomy. 2nd edition, Toronto: C V Mosby Company, 1988.

10. Türkoğlu AÖ. Formaldehitin Sıçan Hipokampusunda Meydana Getirdiği Değişiklikler ve Buna Kafeik Asit Fenetil Ester'in (CAPE) Etkisi. Doktora tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi Bölümü, 2005.
11. Berry M, Bannister LH, Standring SM. Nervous System. Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MWJ (editors). Gray's Anatomy. 38th edition, New York. Churchill Livingstone, 1995:1124-6.
12. Mayer A. Historical Aspects of Cerebral Anatomy. 2nd edition, London: Oxford University Press, 1971: 230.
13. Brodal H. Neurological Anatomy. 3th edition, Oxford: Oxford University Press, 1981.
14. Colonnier M: The structural design of the neocortex. Eccles JC (editor). The Brain and Conscious Experience. Berlin:Sprinter Verlag, 1966.
15. Bliss T, Lomo T. Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant pathways. J Physiol 1973;232:331-56.
16. Gaarskjaer FB. The hippocampal mossy fiber system of the rat studied with retrograde tracing techniques. Correlation between topographic organization and neurogenetic gradients. J Comp Neurology 1981; 203: 717-35.
17. Witter MP, Van Hoesen GW, Amaral DG. Topographical organisation of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. J Neurosci 1989;9:216-28.

18. Noback CR, Demarest RJ. The Nervous System. 3th Edition. New York: McGraw-Hill Book Comp, 1986:265-6.
19. Steward O, Scoville SA. Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. J Comp Neurology 1976;169:347-70.
20. Burt AM. Textbook of Neuroanatomy. 1st edition, Philadelphia: W B Saunders Company, 1993: 479.
21. Cooper LN. Distributed memory in the central nervous system: possible test of assumptions in visual cortex. Schmitt FO, Worden FG, Adelman G, Dennis SG (editors), The Organisation of The Cerebral Cortex. 2nd edition, Cambridge. MIT Press, 1981:479-503.
22. Kandel ER. Cellular Insights into Behavior and Learning. In: The Harvey Lectures. New York: Academic Press Inc. 1979; 73: 19-92.
23. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. Çavuşoğlu H (Çeviren) s.757-1010-38, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1996.
24. Songur A, Akpolat N, Kus I, Ozen OA, Zararsiz I, Sarsilmaz M. The effects of the inhaled formaldehyde during the early postnatal period in the hippocampus of rats: a morphological and immunohistochemical study. Neurosci Res Commun 2003;33:168-78.
25. Green JD: The hippocampus. Field J (editor). Handbook of Physiology. Washington:American Physiological Society, 1960: 1373-89.
26. Taner D. Fonksiyonel Nöroanatomi. 2. Baskı, Ankara: METU Pres, 1999: 231.

27. Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Principles of Neural Science. 4th edition, New York: Mc Graww-Hill Comp, 2000: 1233.
28. Dere F. Nöroanatomi. 3. Baskı (3. Cilt), Adana: Nobel Tıp Kitabevleri, 2000: 428.
29. Moss M, Mahut H, Zola MS. Concurrent discrimination learning of monkeys after hippocampal, entorhinal or fornix lesions. J Neurosci 1981;1:227-40.
30. Kocatürk U. Açıklamalı Tıp Terimleri Sözlüğü. 3. baskı, Ankara: Sevinç Matbaası, 1986: 627.
31. Andreoli TE, Bennett JC, Carpenter CJ, Plum F, Smith LH. Cecil Essentials of Medicine Türkçesi. Siva A (Çeviren) s.748-62, İstanbul, Yüce Yayınları A Ş, 1995.
32. Arıncı K., Elhan A. (1995). Anatomi. Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara.
33. Fawcett D.W. (1986). A textbook of histology. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
34. Keleştimur H. (1996). İnsanda pineal bezin fonksiyonları. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 10, 141-147.
35. Reiter R.J. (1981). The mammalian pineal gland: structure and function. Am J Anat 162, 287-313.
36. Ross M.H., Romrell L.J., Kaye G.I. (1995). Histology. A text and atlas. 3 rd., Williams & Wilkins, Baltimore.
37. Kuş İ., Sarsılmaz M. (2002). Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 22, 221-226.
38. Erlich S.S., Apuzzo M.L.J. (1985). The pineal gland: anatomy, physiology and clinical significance. J Neurosurg 63, 321-341.

39. Gray H. (1995). Gray's Anatomy. 38 th ed., Churchill Livingstone, London.
40. Reiter R.J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrinol Rev* 12, 151-180.
41. Patrickson J.W., Smith T.E. (1987). Innervation of the pineal gland in the rat: an HRP study. *Exp Neurol* 95, 207-215.
42. Tapp E., Huxley M. (1972). The histological appearance of the human pineal gland from peberty to old age. *J Pathol* 108, 137-144.
43. Kus I., Sarsilmaz M., Ogeturk M., Yilmaz B., Kelestimur H., Oner H. (2000). Ultrastructural interrelationship between the pineal gland and the testis in the male rat. *Arch Androl* 45, 119-124.
44. Kus I., Oner H., Ozogul C., Ayar A., Ozen O.A., Sarsilmaz M., Kelestimur H. (2002). Effects of estradiol benzoate on the ultrastructure of the pinealocyte in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinol Lett* 23, 405-410.
45. Kus I., Sarsilmaz M., Ozen O.A., Turkoglu A.O., Pekmez H., Songur A., Kelestimur H. (2004). Light and electron microscopic examination of pineal gland in rats exposed to constant light and constant darkness. *Neuroendocrinol Lett* 25, 102-108.
46. Kuş İ., Özen O.A. (2001). Pineal bezin ışık ve elektron mikroskop düzeyde incelenmesi. *Fırat Tıp Dergisi* 6, 436-441.
47. Kuş İ., Öner H., Songur A., Sarsılmaz M. (2002). Sıçanlarda ovarektominin ve ovarektomi sonrası uygulanan östrojenin pineal bez üzerine etkisi: ışık mikroskopik çalışma. *Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 18, 9-17.

48. Kuş İ., Songur A., Ögetürk M., Özen O.A., Pekmez H., Sarsılmaz M. (2003). Sıçanlarda testosteron hormonunun pineal bez üzerine etkisi: ışık mikroskopik çalışma. Fırat Tıp Dergisi, 8, 1-6.
49. Calvo J., Boya J. (1984). Ultrastructure of the pineal gland in the adult rat. J Anat 138, 405-409.
50. Calvo J., Boya J., Borregon A., Garcia Maurino J.E. (1988). Presence of glial cells in the rat pineal gland: a light and electron microscopic immunohistochemical study. Anat Rec 220, 424-428.
51. Leeson T.S., Leeson C.R., Paparo A.A. (1988). Text / Atlas of Histology. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
52. Cagnacci A. (1996). Melatonin in relation to physiology in adult humans. J Pineal Res 21, 200-213.
53. Cagnacci A., Volpe A. (1996). Influence of melatonin and photoperiod on animal and human reproduction. J Endocrinol Invest 19, 382-411.
54. Diaz Lopez B., Diaz Rodriguez E., Urquijo C., Alvarez C. (2005). Melatonin influences on the neuroendocrine-reproductive axis. Ann NY Acad Sci 1057, 337-354.
55. Kus I., Akpolat N., Ozen O.A., Songur A., Kavakli A., Sarsilmaz M. (2002). Effects of melatonin on Leydig cells in pinealectomized rat: an immunohistochemical study. Acta Histochem 104, 93-97.
56. Kuş İ., Öner J., Songur A., Özen O.A., Sarsılmaz M. (2003). Sıçanlarda melatonin hormonunun tiroid folliküler hücreleri üzerine etkisi: AgNOR boyama ve elektron mikroskopik çalışma. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 19, 1-8.

57. Kuş İ., Öner H., Ögetürk M., Kavaklı A., Zararsız İ., Sarsılmaz M. (2003). Pinealektomili sıçanlarda tiroid parafolliküler hücrelerinin ışık ve elektron mikroskop düzeyde incelenmesi. Fırat Tıp Dergisi 8, 197-200.
58. Oner H., Kus I., Oner J., Ogeturk M., Ozan E., Ayar A. (2004). Possible effects of melatonin on thymus gland after pinealectomy in rats. Neuroendocrinol Lett 25, 115-118.
59. Stastica P., Ulanski P., Rosiak J.M. (1998). Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. J Pineal Res 25, 65-66.
60. Zang L.Y., Cosma G., Gardner H., Vallyathan V. (1998). Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. Biochim Biophys Acta 1425, 469-477.
61. Longoni B., Salgo M.G., Pryor W.A., Marchiafava P.L. (1998). Effects of melatonin on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. Life Sci 62, 853-859.
62. Sewerynek E., Melchiorri D.A., Chen L., Reiter R.J. (1995). Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro. Free Radic Biol Med 19, 903-909.
63. Kuş İ., Zararsız İ, Yılmaz H.R., Türkoğlu A.Ö., Pekmez H., Sarsılmaz M. (2004). Sıçan prefrontal korteksinde formaldehit maruziyetiyle oluşan oksidatif hasara karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisi. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 13, 1-7.
64. Arendt J. (1988). Melatonin. Clin Endocrinol 29, 205-209.
65. Hansen J.M., Go Y.M., Jones D.P. (2006). Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. Annu Rev Pharmacol Toxicol 46, 215-234.

66. Reiter R.J., Carneiro R.C., Oh C.S. (1997). Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 29, 363-372.
67. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-57
68. Öztürk F. (2002). Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 9, 143-146
69. Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol.* 1994; 8: 665-73.
70. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-1321.
71. Ergin M. (2002). Apoptosis. *Arsiv* 11, 495-504.
72. McDonald E.S., Windebank A.J. (2000). Mechanisms of neurotoxic injury and cell death. *Neurol Clin* 18, 525-40.
73. Walker N.I., Harmon B.V., Gobe G.C., Kerr J.F. (1988). Pattern of cell death. *Methods Arhieve Exp Pathol* 13, 18-54.
74. Strasser A., O'Connor L., Dixit V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-45.
75. Lawen A., Grutter M.G. (2000). Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 10, 649-55.
76. Deveraux Q.L., Schendel S.L., Reed J.C. (2001). Antiapoptotic proteins. The bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Cardiol Clin* 19, 57-74.
77. Friedlander R.M., Hengartner M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 1407, 770-76.
78. Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. (1999). Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911.

79. Osborn M. (1994). Immunofluorescence microscopy of cells. "cell biology: a laboratory handbook" J.E Celis (editör). Academic Press, San Diego. S: 347-351
80. Songur A. (2001). Sıçanlarda solunan formaldehitin postnatal gelişim sürecinde formatio hippocampi üzerine etkilerinin morfolojik olarak incelenmesi. Doktora Tezi, Elazığ.
81. Köhler G., Milstein C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-97.
82. Polak J.M., Noorden S.V. (1988). An introduction to immunocytochemistry: current techniques and problems. Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks. London.
83. Hsu S.M., Raine L., Fanger H. (1981). Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 29, 577-80.
84. Sun Y., Oberley L.W., Li Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 34, 497-500.
85. Paglia D.E., Valentine W.N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 70, 158-69.
86. Esterbauer H., Cheeseman K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol 186, 407-21.
87. Akyol Ö. (1994). Beyin tümörlerinde doku SOD, CAT ve GSH-Px Caktiviteleri. Uzmanlık tezi, Ankara.

88. Kamal A.A., Gomaa A., El Khafif M., Hammad A.S. (1989). Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dust. *Environ Res* 49, 173-180.
89. Delibaş N, Tüzmen N, Kılınç İ, Altuntaş İ. Fonksiyonel pinealektominin genç ve yaşlı ratlarda kan, beyin ve hipokampus lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerine etkisi. *Türk Biyokimya Dergisi* 2002; 27(3): 94-100.
90. Ates O, Cayli S, Gurses I, Yucel N, Iraz M, Altinoz E, Kocak A, Yologlu S. Effect of pinealectomy and melatonin replacement on morphological and biochemical recovery after traumatic brain injury. *Int J Dev Neurosci.* 2006; 24(6):357-363.
91. Reiter RJ, Tan D, Kim SJ, Manchester LC, Augmentation of indices of oxidative damage in life-long melatonin-deficient rats. *Mechanisms of Ageing and Development* 1999; 110: 157–173
92. Turgut M, Uyanıkgil Y, Ateş U, Baka M, Yurtseven ME. Pinealectomy stimulates and exogenous melatonin inhibits harmful effects of epileptiform activity during pregnancy in the hippocampus of newborn rats: an immunohistochemical study. *Childs Nerv Syst* 2006; 22: 481–488.
93. De Butte M, Pappas BA. Pinealectomy causes hippocampal CA1 and CA3 cell loss: reversal by melatonin supplementation. *Neurobiol Aging.* 2007; 28(2):306-313.
94. Arendt J. Melatonin. *Clin Endocrinol* 1988, 29: 205-209.
95. Kuş İ, Sarsılmaz M. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. *T Klin J Med Sci* 2002, 22: 221-226.

96. Forsling ML, Stoughton RP, Zhou Y, Kelestimur H, Demaine C. The role of the pineal in the control of the daily patterns of neurohypophysial hormone secretion. *J Pineal Res* 1993, 14: 45-51.
97. Kus I, Akpolat N, Ozen OA, Songur A, Kavakli A, Sarsilmaz M. Effects of melatonin on Leydig cells in pinealectomized rat: an immunohistochemical study. *Acta Histochem* 2002, 104: 93-97.
98. Guerrero JM, Reiter RJ. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr Res* 1992, 18: 91-113.
99. Ayar A, Kutlu S, Yilmaz B, Kelestimur H. Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium in vitro. *Neuroendocrinol Lett* 2001, 22: 301-306.
100. Tan DX, Chen LD, Poeffeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1993, 1: 57-60.
101. Pieri CP, Marra M, Morini F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994, 55: 271-276.
102. Stastica P, Ulanski P, Rosiak JM. Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. *J Pineal Res* 1998, 25: 65-66.
103. Zang LY, Cosma G, Gardner H, Vallyathan V. Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1425: 469-477.
104. Longoni B, Salgo MG, Pryor WA, Marchiafava PL. Effects of melatonin on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. *Life Sci* 1998, 62: 853-859.
105. Sewerynek E, Melchiorri DA, Chen L, Reiter RJ. Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro. *Free Radic Biol Med* 1995, 19: 903-909.

106. Melchiorri D, Reiter RJ, Sewerynek E, Hara M, Chen L, Nistico G. Paraquat toxicity and oxidative damage. Reduction by melatonin. *Biochem Pharmacol* 1996, 51: 1095-1099.
107. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997, 29: 363-372.
108. Skaper SD, Floreani M, Ceccon M, Facci L, Giusti P. Excitotoxicity, oxidative stress, and the neuroprotective potential of melatonin *Ann N Y Acad Sci* 1999, 890: 107-118.
109. Kabuto H, Yokoi I, Ogawa N. Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharges in rats by suppressing peroxidation. *Epilepsia* 1998, 39: 237-243.
110. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Kim SJ, El-Sokkary GH. Melatonin protects hippocampal neurons in vivo against kainic acid-induced damage in mice. *J Neurosci Res* 1998, 54: 382-389.
111. Mason RP, Leeds PR, Jacob RF, et al. Inhibition of excessive neuronal apoptosis by the calcium antagonist amlodipine and antioxidants in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1999, 72: 1448-1456.
112. Kaptanoglu E, Palaoglu S, Demirpence E, Akbiyik F, Solaroglu I, Kilinc A. Different responsiveness of central nervous system tissues to oxidative conditions and to the antioxidant effect of melatonin. *J Pineal Res* 2003, 34: 32-35.
113. Erol FS, Topsakal C, Ozveren MF, et al. Protective effects of melatonin and vitamin E in brain damage due to gamma radiation: an experimental study. *Neurosurg Rev* 2004, 27:65-69.

114. Kuş İ, Zararsız İ, Yılmaz H. R, Türkoğlu A. Ö, Pekmez H. ve Sarsılmaz M. “Sıçan prefrontal korteksinde formaldehit maruziyetiyle oluşan oksidatif hasara karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisi”, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2004; 13:1-7
115. Zararsız İ, Kuş İ, Ögetürk M, Akpolat N, Köse E, Meydan S, ve Sarsılmaz M. “Melatonin reverts formaldehyde-induced neurotoxicity in prefrontal cortex of rats: an immunohistochemical and biochemical study,” *Cell Biochem. Funct.* 2007; 25(4): 413-418.
116. Antolin I, Mayo JC, Sainz RM, Brijo MA, Herrera F, Martin V, Rodriguez C. P rotective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson’s disease. *Brain Research* 2002; 943: 163–173.
117. Sinha K, Degaonkar MN, Jagannahan NR, Gupta YK. Effect of melatonin on ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *European Journal of Pharmacology* 2001; 428: 185–192.
118. Ozdemir D, Tugyan K, Uysal N, Sonmez U, Sonmez A, Acikgoz O, Ozdemir N, Duman M, Ozkan H. Protective effect of melatonin against head trauma-induced hippocampal damage and spatial memory deficits in immature rats. *Neurosci Lett.* 2005; 385(3): 234-239.
119. Kuş, İ, Zararsız İ, Ögetürk M. ve Yılmaz H.R. “Formaldehit nörotoksisitesine bağlı hipokampusta gelişen oksidatif hasar ve melatonin hormonunun koruyucu etkisi: Deneysel bir çalışma”, *Fırat Tıp Dergisi* 2007; 12: 256-260.
120. Shen YX, Xu SY, Wang XL, Wang H. “Melatonin blocks rat hippocampal neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide” *Pineal Res.* 2002; 32: 163-167

