



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA MEMANTİN VE MELATONİN
TEDAVİSİNİN TRAVMATİK BEYİN HASARI
SONRASI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Taha KELEŞTEMUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ahmet AYAR

TRABZON-2013

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

03.01.2013

Taha Keleştemur

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamın yürütülebilmesi için bana her türlü desteği sağlayan tez danışmanım **Prof. Dr. Ahmet AYAR** ve **Doç. Dr. Sinan CANPOLAT**'a ve çalışmamı okuyup düzeltmekte büyük yardımlarından dolayı **Prof. Dr. Bayram YILMAZ** ve **Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ**'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmam esnasında göstermiş oldukları destek ve yardımlarından dolayı ve çalışmamda göstermiş oldukları teknik destekten dolayı ekip arkadaşlarım **Burak ÇAĞLAYAN**, **Mustafa Çağlar BEKER** ve **Berrak ÇAĞLAYAN**'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırmanın yapılması ve tezimin hazırlanması sırasında, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen ve yoğun çalışma dönemlerinde beni anlayışla karşılan **sevgili eşim Seda KELEŞTEMUR**'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İç kapak sayfası

Sayfa

BEYAN

TEŞEKKÜR

ŞEKİLLER DİZİNİ

viii

KISALTMALAR, ŞEKİLLER ve FORMÜLLER

ix

1. ÖZET

1

2. SUMMARY

2

3. GİRİŞ ve AMAÇ

3

4. GENEL BİLGİLER

4

4.1 Travmatik Beyin Hasarı

4

4.1.1 Patofizyoloji

4

4.2 Eksitotoksisite

4

4.3 Serbest Radikaller

7

4.3.1 Nitrik Oksit

7

4.3.2 Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Koruyu Sistemler

8

4.4 Travmatik Beyin Hasarı ve Oksidatif Stres

9

4.5 Yangı ve Travmatik Beyin Hasarı

9

4.6 Apoptoz / Nekroz ve Travmatik Beyin Hasarı

10

4.7 Memantin

10

4.8 Melatonin

11

4.8.1 Antioksidatif Ajan Olarak Melatonin

14

4.8.2 Melatoninin Hidrojen Peroksit ile İlişkisi

15

4.8.3 Melatoninin Hidroksil Radikali ile İlişkisi

16

4.8.4 Melatoninin Singlet Oksijen ile İlişkisi

16

4.8.5 Melatoninin Peroksil Radikali ile İlişkisi

16

4.8.6 Melatonin Nitrik Oksit ve Peroksi Nitrit ile İlişkisi

16

4.8.7 Melatonin Reseptörleri ve Etkileşimde Olduğu Proteinler

18

4.9 Deneyisel Kafa Travma Modelleri

19

5. GEREÇ ve YÖNTEMLER

21

5.1 Deneyisel Travmatik Beyin Hasarı Modeli

21

5.3.1 Cresyl Violet Boyaması	23
5.3.2 TUNEL Boyaması	23
5.4 Davranış Testi	25
5.4.1 Açık-Alan Testi	25
5.5. İstatistik	26
6. BULGULAR	27
6.1 Hasar Hacmi ve Alanı	27
6.2 Apoptoz	29
6.3 Davranış Testi	30
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	34
8. KAYNAKLAR	37
9. ETİK KURUL ONAYI	47
10. ÖZGEÇMİŞ	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Serbest oksijen radikallerin kaynakları	8
Şekil 2. Memantinin kimyasal yapısı	11
Şekil 3. Serotonin aracılığıyla triptofandan melatonin sentezi	14
Şekil 4. Antioksidan olarak melatonin metabolitleri	15
Şekil 5. Melatoninin serbest radikallerin giderilmesinde rolü	17
Şekil 6. Travmatik beyin hasarı deney modeli (A), travma sonrası beyin dokusu (B)	22
Şekil 7. Bregma seviyesinden alınan kesit bölgesi	24
Şekil 8. Açık-Alan testi	25
Şekil 9. Koronal kesitlerden hesaplanan hasar hacmi	27
Şekil 10. Koronal kesitlerde cresyl violet boyaması	28
Şekil 11. Koronal kesitlerden hesaplanan hasar alanı	28
Şekil 12: Tunel (+) hücre sayısı	29
Şekil 13. Travma sonrası hayvanların kenar bölgesinde gezinme süreleri	30
Şekil 14. Travma sonrası hayvanların merkez bölgesinde gezinme süreleri	31
Şekil 15. Travma sonrası hayvanların açık-alan testinde hareketsiz kaldığı süre	31
Şekil 16. Travma sonrası hayvanların açık-alan testinde hareketli olduğu süre	32
Şekil 17. Travma sonrası grupların açık-alan testinde katettiği toplam mesafe	33

KISALTMALAR, ŞEKİLLER ve FORMÜLLER

Kısaltmalar

AFMK	N^1 -asetil- N^2 -formil-5-metoksikinuramin
AMK	N^1 -asetil-5-metoksikinuramin
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionik asit
ATP	Adenozin Trifosfat
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CAT	Katalaz
CO₃⁻	Karbon Trioksit
EAA	Eksitatör Amino Asit
G-6PD	Glükoz-6-fosfat dehidroge ^{na} z
GER	Granüllü endoplazmik retikulum
GIS	Gastrointestinal Sistem
GPx	Glutasyon peroksidaz
GRd	Glutasyon redüktaz
GSS	Ganglion servikale süperior
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HRP	Horseradish preoksit
İ.P.	İntra Peritoneal
LOO	Peroksil Radikali
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
N-A-N-F-5-M	N-asetil-N-formil-5-metoksikinuramine
NCS	Nukleus suprakiazmatikus
NMDA	N-methyl-D-aspartat

NO	Nitrik Oksit
NO₂	Nitrojen Dioksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O₂⁻	Süperoksit
OH⁻	Hidroksil Radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
SCN	Suprakiazmatik nukleus
SOD	Süper Oksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikali
TRH	Traktus Retinohipotalamik
VDKK	Voltaja duyarlı kalsiyum kanalları

ÖZET

Sıçanlarda Memantin ve Melatonin Tedavisinin Travmatik Beyin Hasarı

Sonrası Etkilerinin Araştırılması

Kafa travması sonrası oluşan beyin hasarı, N-methyl-D-aspartate (NMDA) reseptör aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} homeostazisinde bozulma, oksidatif stresi içeren kompleks patofizyolojik süreçler sonucunda gelişmektedir. Ekstrasinaptik NMDA reseptör inhibitörü memantin ve serbest radikal giderici melatonin, insanlarda yan etkilerinin az olmaları nedeniyle nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanımları söz konusu olan moleküllerdir. Bu çalışmada memantin ve melatoninin travmatik beyin hasarına olan etkileri Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlarda karşılaştırmalı olarak araştırıldı. Rompun ve ketasol anestezisi altında, 10 gram ağırlığında metal silindirin 50 cm yükseklikten kafa tası kemiğinde açılmış olan 6 mm çapındaki açıklıktan direk beyin üzerine düşürülmesi ile beyin travması oluşturuldu. Travmanın hemen sonrası sıçanlara memantin, melatonin ve memantin/melatonin kombinasyonu uygulaması yapıldı. Davranış incelemesi sonrasında, travmadan 24 saat sonra hasar hacmi, apoptotik hücre ölümü belirlendi. Yapılan çalışma sonucunda memantin ve melatonin tedavilerinin beyin hasarını azalttığı belirlenmesine rağmen her iki molekülün birlikte kullanıldığı sıçanlarda beyin hasarının anlamlı olarak daha da azaldığı belirlenmiştir. TUNEL boyaması ile yapılmış olan apoptoz değerlendirmesinde her üç tedavinin de hasarı azalttığı fakat bu azalmanın memantin/melatonin kombinasyonu sonrasında kontrolün yanında diğer tedavi gruplarına göre de anlamlı olduğu belirlendi. Davranış testi incelemesinde hasar büyüklüğü ile bir paralellik gözlemlendi. Tedavi gruplarında motor koordinasyonun daha iyi olmasının yanında depresif hareketlerin daha az olduğu ve kontrole göre daha iyi hareket ettikleri belirlendi. Sonuç olarak kafa travması sonrası memantin ve melatoninin farklı patolojik süreçleri etkilemelerinin etkisiyle her iki molekülün beraber kullanıldığı sıçanlarda daha az hasarın ve apoptotik hücre ölümünün gözlemlenmesi bu moleküllerin kombinasyonlarının klinik çalışmalarda kullanılmasına da katkıda bulunmaktadır.

Anahtar Sözcükler: apoptoz, melatonin, memantin, travmatik beyin hasarı, sıçan

SUMMARY

Investigation the Effects of Memantine and Melatonin Treatment after Traumatic Brain Injury in Rats

Brain injury following head trauma occurs after complex pathophysiological processes including activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, disruption of intracellular calcium (Ca^{+2}) homeostasis and oxidative stress. Extrasynaptic NMDA receptor inhibitor, memantine, and free radical scavenger, melatonin, have fewer side effects and are used in humans in treatment of neurodegenerative disorders. In this study, the effects of memantine and melatonin on traumatic brain injury was investigated in male Sprague-Dawley rats. Brain trauma was generated by dropping a 10 grams of metallic cylinder from 50 cm height, directly onto the brain over a hole with 6 mm diameter on the skull, under rompun and ketasol anesthesia. Immediately after trauma memantine, melatonin and memantine/melatonin combination were applied to rats. At the end of behavioral examination, injury volume 24 hours later than trauma and apoptotic cell death were determined. At the end of the study, although it was identified that memantine- and melatonin-only treatments also reduced brain damage, reduction in brain damage was more significant in rats treated with this combination treatment. In evaluation of apoptosis with TUNEL staining, damage was determined to be lower in all three of the treatments, however it was determined that this reduction was significant in memantine/melatonin combination as compared to control as well as other treatment groups. Open field examination was in compliance with the infarct area. In addition to better motor coordination, less depressive behaviour and better movement was identified in treatment groups compared to control. Consequently, since memantine and melatonin individually affect different pathological processes after brain trauma, the observation that injury and apoptotic cell death were reduced in rats treated with memantine and melatonin combination, lead to the use of this combination in clinical studies.

Keywords: apoptosis, melatonin, memantin, rat, traumatic brain injury

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Travmatik beyin hasarı özellikle genç yaş nüfusunda en fazla ölüm ve sakatlık nedeni olmasına rağmen patofizyolojisi ve tedavisi konusunda yapılan çalışmalar henüz tatminkar düzeyde değildir. Bu kapsamda klinikte nörodejeneratif hastalıkların tedavisi amacıyla henüz tedavide kullanılan bir ilaç geliştirilememiştir. Nöroprotektif etkili olduğu düşünülen ve klinik çalışmalarda denenen ilaçların tamamına yakını özellikle insanlarda karşılaşılan yan etkileri nedeni ile başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Travmatik beyin hasarının patofizyolojisi ele alındığında, NMDA reseptörünün aşırı aktivasyonu (eksitotoksisite) ve serbest radikal üretimi sonrasında ortaya çıkan hücre ölüm süreçlerinin oluşan hasarın oluşumunda başlıca rol oynadıkları görülmektedir. Bu nedenle bu çalışmada insanlarda iyi tolere edilen ve hali hazırda klinikte uyku düzensizliklerinin veya Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanım alanı bulmuş olan ekstrasinaptik NMDA reseptör antagonisti memantin ve serbest radikal giderici melatoninin etkileri kafa travması modelinde araştırılmıştır. İkili kombinasyonun amacı hem moleküllerin ayrı ayrı etkilerinin araştırılması hem de iki farklı etki mekanizmasına sahip olan bu moleküllerin birlikte kullanılmalarının tedavinin etkinliği üzerine olabilecek olası pozitif etkilerinin değerlendirilmesidir. Elde edilecek olumlu bulguların bu moleküllerin klinikte kafa travmasının sonrası tedavi amaçlı kullanımına katkı sağlaması beklenmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Travmatik Beyin Hasarı

Travmatik beyin hasarı kafatası kemiğinin parçalanması sonrasında direk olarak veya serebrospinal sıvı gibi beyin koruyucu mekanizmalarının üzerine alınan darbeler sonucunda kafatası kırılmaksızın dolaylı olarak meydana gelmekte olup kalıcı veya geçici nörolojik, psikolojik ve fonksiyonel bozukluklar ile karakterizedir (1).

Epidemiyolojik açıdan kafa travmaları, dünyada mortalitesi ve morbiditesi en fazla olan üçüncü hastalıktır. Kafa travmaları genellikle beş yaş altı çocuklarda, 15-24 yaş arası yetişkinlerde ve 75 yaş üzeri yaşlılarda görülmektedir. Kafa travmalarının meydana gelmesindeki başlıca nedenler arasında araç kazaları, düşme ve boks ve kick-boks gibi doğrudan kafaya darbelerin olduğu spor dallarıdır. Şiddet olayları ise kafa travmalarının %20'lik bir kısmını oluşturmaktadır (2).

4.1.1 Patofizyoloji

Travmatik beyin hasarı sonrası alınan darbenin şiddeti ile paralellik gösteren birbirine bağlı olan primer ve sekonder hasarlar ile karşılaşılabilir. Primer beyin hasarı; travmanın hemen sonrasında doku bütünlüğünün bozulmasının akabinde beyinde meydana gelen hasar için kullanılmakta olup sekonder hasar primer hasara bağlı olarak zamana bağlı gelişen NMDA reseptör aktivasyonu (eksitotoksiste), serbest radikal üretimi, aksonal dejenerasyon ve bunu takiben programlı ve programsız hücre ölümü gibi patofizyolojik olayları içermektedir (3-5).

4.2 Eksitotoksiste

İlk olarak 1969 yılında Olney ve Sharp eksitator amino asit (EAA) glutamatın nöronlar üzerinde toksik etki oluşturabileceğini öne sürerek eksitotoksiste kavramını tanımlamışlardır (6). *İn-vivo* ve *in-vitro* yapılan deneyler sonucu, fazla miktarlarda eksitator amino asit ve analoglarının nörodejenerasyona neden olduğu bilinmektedir (7-10).

(Na⁺) iletkenliğinin aktivasyonundan dolayı oluşan presinaptik depolarizasyon sinir terminallerine ulaştığında voltaja duyarlı Ca⁺² kanallarından (VDKK) Ca⁺² girişi, EAA'lerin salınmasına sebep olmaktadır. Postsinaptik membranların dendrit ve somalarında başlıca T ve L tipi kanallar bulunurken, VDKK muhtemelen N tipi kanalları içermektedir (8,11,12).

Bununla birlikte, EAA'ler Na^+ gradient ve membran potansiyeliyle yönlendirilen elektrojenik $2\text{Na}^+ / \text{glutamat}$ kotransportuyla Ca^{+2} girişinden bağımsız olarak da salınabilmektedir. Eğer iskemide olduğu gibi, Na^+ gradienti bozulur ve membran depolarize olursa, EAA'lerin salınımı katalizlenir (8).

Glutamat reseptörleriyle iyon kanallarının uyarılmasını izleyerek postsinaptik membrandan Na^+ girişi meydana gelir. EAA'ler agonistlerine bağlı olarak 5 kategoride sınıflandırılır. Bunlar; yüksek ve düşük affiniteli kainat, amino -3-hidroksi -5- metil -4-isoazol propiyonik asit (AMPA), NMDA ve kiskalat reseptörleridir. Bunlardan ilk 4'ü iyon kanalları aracılığıyla etki ettiklerinden iyonotropiktir (12,81).

Glutamat, presinaptik sinir uçlarından salındığında AMPA ve NMDA reseptörlerinin her ikisini de uyaran karışım bir agonisttir. AMPA reseptörü Na^+ , K^+ ve muhtemelen de H^+ katyon kanallarına bağlanarak etkisini gösterir. Na^+ 'un girmesi depolarizasyona neden olur. Glutamat reseptör kapılarının alt tipi olan NMDA monovalan katyon ve Ca^{+2} 'un her ikisine de geçirgendir. Kanal normalde Mg^{+2} ile kapatılmıştır, fakat membranın depolarizasyonu bu blokajdan kurtulur (13-15). AMPA reseptör bağımlı kanallar yoluyla Na^+ girişi depolarizasyona sebep olur, böylece NMDA kanalları yoluyla Ca^{+2} girişini sağlar. Na^+ girişiyle meydana gelen depolarizasyon L ve T tipi VSCC'ler arasından Ca^{+2} girişini sağlar. Buna ilave giriş yolu $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değiştiricisidir. Böylece Na^+ gradienti ve/veya depolarizasyonun azalması Ca^{+2} girişini kapatan değiştiriciyi tersine çevirebilir. $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ değişimini tersine çevirmek için ihtiyaç duyulan Na^+ gradientindeki azalma intrasellüler asidoz ile uyarılan Na^+/H^+ değişiminin sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Kısacası, glutamat reseptörlerinin aktivasyonu çoklu Ca^{+2} iletimi üzerinden etkisini gösterir. EAA'lerin salınımı ve iyonotropik glutamat reseptörlerinin aktifleşmesi bir çok iyonla karşı membran geçirgenliğinin artışına sebep olur (8,12,16).

Reseptörlerin glutamat ile aktivasyonunu içeren eksitatör olayları Ca^{+2} girişi izler. Eksitatör olayların sonlandırılması, EAA'lerin geri alınması ve inhibitör mekanizmalarla sağlanır. Hiperpolarize membrana dikkat edildiğinde, inhibisyon başlıca iyon akışı ile sağlanır. Genelde K^+ veya Cl^- iletiminin aktivasyonunu inhibisyon izler. Bu Cl^- iletimindeki artış membran potansiyelinin normal değerlere kapanmasına sebep olurken, K^+ çıkışı da membranları hiperpolarize etmektedir. İnhibitör kontrolün

K⁺ iletiminin aktivasyonu ile olduğu gör÷lmektedir. Önce K⁺ kanalları açılır ve pozitif iyon yükü hücreyi terk eder ve membran hiperpolarize olur (17).

EAA ve bunların analogları, NMDA ve non-NMDA reseptörlerini aktive ederek hücre içine Na⁺, Cl⁻ iyonları ve su girmesi ile hızlı şişmeye neden olmaktadır (18,19). Gecikmiş hücre ölümü ise NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması ve buna bağılı ortaya çıkan Ca⁺² un içeri akması ile olmaktadır (20). Glutamata kısa fakat yoğun maruz kalınması, NMDA reseptörlerine bağılı mekanizmalar ile gecikmiş hücre ölümüne neden olur (21). Fosfolipaz A₂ ve kalpain gibi Ca⁺² 'a bağılı enzimlerin aktivasyonu ve serbest radikal üretimi de bu süreçte rol alır (22-25). İntrasellüler Ca⁺² 'un genel artışı her zaman hücre ölümüne neden olmadığı için NMDA reseptörleri çevresinde lokalize artışların nitrik oksit sentatazın aşırı uyarılmasına neden olduğu ve böylece ölümcül olayların tetiklendiğı düşün÷lmektedir (25). NMDA'a bağılı nöronal toksisitenin kısmen NOS inhibitörleri ile bloke edilmesi ve nöronal NOS ekspresyonu olmayan nöronların NMDA toksisitesine daha dayanıklı olmaları da bu görüşü desteklemektedir (26,27).

NMDA'ya bağılı hücre ölümünün tersine AMPA / Kainat reseptörlerinin nöron ölümüne neden olabilmesi için uzun süre uyarılması gerekmektedir (28). Bu süreçte AMPA / Kainat'a bağılı Ca⁺² kanalları aracılığı ile hücre içine giren Ca⁺² rol oynayabilir (9,29). İskemi sırasında artan asidite NMDA reseptör aşırı uyarımını inhibe ederken, iskemi sonucu oluşan depolarizasyon NMDA reseptör aktivasyonunu artırır (17). *In-vivo* ve *in-vitro* iskemi sırasında NMDA akımlarının hızla kaybolduğı gösterilmiştir (30,31). Ancak NMDA reseptörlerinin inaktif hale geçmeden önce artmış glutamata maruz kalmaları, enerji yoksunluğı olan bu ortamda, hücre ölümüne neden olan olayları başlatmaya yeterli olabilmektedir. Bununla birlikte penumbra (infarkt alanı) bölgesinde NMDA reseptörlerinin uyarılma süresi daha uzundur. (32,33). Hayvan modellerinde yapılan deneylerde NMDA reseptör antagonistlerinin ve Ca⁺² kanal blokerlerinin bu nedenle iskemik doku miktarını azalttığı düşün÷lmektedir. Ancak bu maddeler asiditenin fazla olduğı global iskemi modellerinde daha az etkili olmuşlardır (34). Tüm bunlar penumbra bölgesinde eksitotoksik hasarın önemini ortaya koymuştur. Son zamanlarda peri-enfarkt bölgelerde ortaya çıkan tekrarlayıcı "spreading depresyonun", dokuları sistemli eksitotoksik strese maruz bırakabileceğı öne sür÷lmüştür (33). Çok kısa süreli glutamata maruz kalmanın hücre ölümüne neden olan olayları başlatması

nedeni ile reseptör antagonistleri yerine, reseptör bağlanmasını takiben ortaya çıkan olayları bloke eden ajanların daha etkili olabileceği düşünülebilir.

4.3 Serbest Radikaller

Moleküllerin ve atomların yapısındaki elektronlar çiftler halinde bulunmaktadır. Bu çiftler nükleus çevresinde bulunan boşluklarda hareket ederler. Çiftleşmemiş elektron yapılarına serbest radikal denilmektedir. Bu çiftleşmemiş elektronlar atomun veya molekülün kimyasal reaktivitesini değiştirerek onu daha reaktif hale getirirler (35,36).

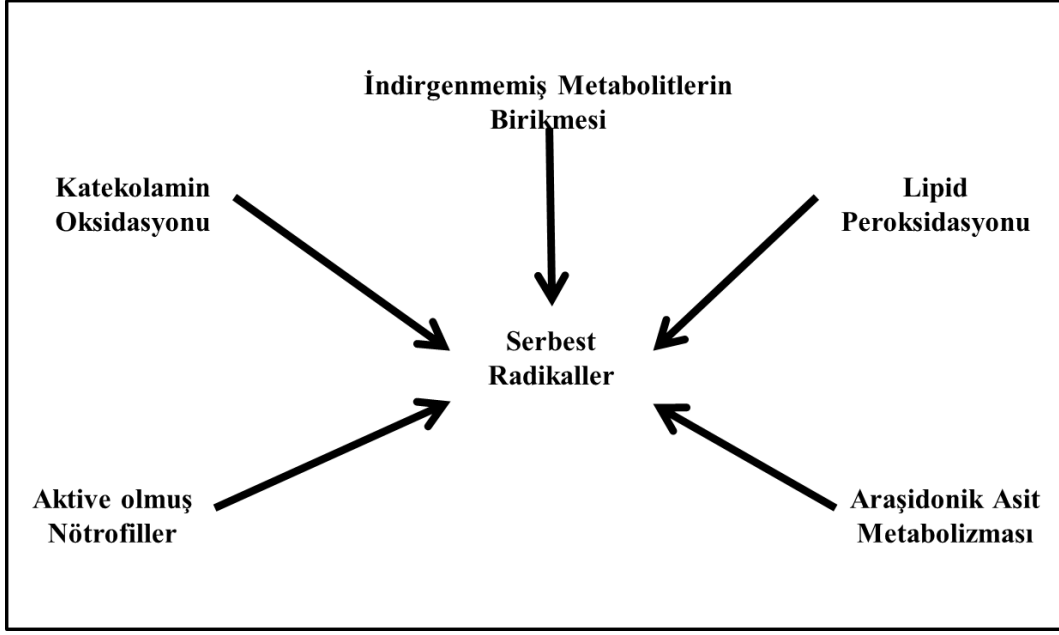
Reaktif serbest radikaller, radikal olmayan pek çok molekül ile reaksiyona girebilirler. Serbest radikal zincir reaksiyonları ile daha başka radikallerin meydana gelmesine neden olurlar (37).

Herhangi bir iskemik durumun olmadığı normal şartlar altında serbest oksijen radikal (SOR) üretimi ve yıkımı arasında her zaman bir denge mevcuttur. Fakat iskemik durumlarda (ödem, damar hasarı) SOR üretimi artmaktadır. Örneğin serebral iskemide rol oynayan SOR'lar arasında süperoksit (O_2^-), nitrik oksit (NO), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-) sayılabilir (39,40).

MSS'deki hücreler membran lipitleri doymamış yağ asitleri ve kolesterolce zengindir. Bu nedenle serbest radikallere karşı duyarlıdır ve beyin radikallere karşı koruyucu enzimlerden yoksundur. Beyinde demir konsantrasyonu yüksektir bu da serbest radikal oluşumunu artıran bir özelliktir. Serbest radikal oluşumu başladıktan sonra kendiliğinden yayılan bir olaylar zinciridir. Bu zincir demir varlığında daha da şiddetini artırmaktadır. Bu olayların tümü bize MSS'nin serbest oksijen radikallerine karşı duyarlı olduğunu göstermektedir (25).

4.3.1 Nitrik Oksit

NO, L-arginin aminoasidinden NOS enzim kompleksleri tarafından sentezlenir. MSS de L-argininin NO yolu gösterilmiştir. Sıçan serebellar hücrelerinin bir glutamat reseptörünün antagonisti olan NMDA tarafından uyarılmasıyla endotelden türevlenen bir relaksasyon faktörü olarak salınmaktadır (41,43). NO ayrıca sinir sisteminin yayıldığı tüm vücut bölgelerinde bir nörotransmitter madde olarak işlev görmektedir. İnsan ve hayvan beyinlerinin neredeyse bütün bölgelerinde NO sentezinin olduğu bilinmektedir. EAA'lerin uyarılmasıyla NOS aktivasyonu olur ve sonuçta yüksek NO sentezi ile serebral iskemi oluşmaktadır (41,42).



Şekil 1. Serbest oksijen radikallerin kaynakları

4.3.2 Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Koruyu Sistemler

Antioksidan maddeler, okside edilebilir bir madde ile karşılaştıkları zaman, düşük konsantrasyonda bile o maddenin oksidasyonunu engelleyen veya geciktiren maddelerdir. Antioksidanlar, radikal oluşumunu engellemek için meydana gelen hasarın herhangi bir evresinde hücreyi etkileyebilirler. Antioksidan maddeler, lokal oksijen konsantrasyonunun düşmesini veya oksijenin ortamdan uzaklaştırılmasını, katalitik metal iyonlarının ortamdan uzaklaştırılmasını, O_2^- ve H_2O_2 gibi reaktif oksijen türlerini, non-radikal ürünlere çevirerek ortamdan uzaklaştırılmasını, singlet oksijenin temizlenmesi veya bastırılmasını sağlarlar (44).

Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT), sırasıyla O_2^- ve H_2O_2 'in toksik etkisinin giderilmesini sağlayan enzimlerdir. Aerobik metabolizma sırasında toksik oksijen ürünlerini ortamdan uzaklaştırırlar. Alfa-tokoferol yani E vitamini hücre membranına bağlanabilen, zincir reaksiyonunun kırılmasında rol oynayan bir antioksidan maddedir. Lipid peroksidasyonu başladığı zaman peroksil radikalleri alfa-tokoferol ile reaksiyona girer ve oksidatif süreci sonlandırır. Melatonin, $HO^\cdot$ temizleyen ve günümüzde de bilinen en etkili ve güçlü bir antioksidandır. Lipofilik özelliği sayesinde kan-beyin bariyeri de dahil birçok kompartmana girerek bu özelliğini gösterebilir (46-48).

4.4 Travmatik Beyin Hasarı ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, gerek ani gerekse gecikmiş hücre ölümlerinden sorumlu olan bir olaydır. Beyin dokusunun aşırı miktarda oksijene ihtiyacı vardır ve buna bağlı olarak yüksek oranda oksijen tüketmektedir. Bu durum da beyni oksidatif strese karşı duyarlı kılmaktadır. Travmatik beyin hasarından sonra kan-beyin bariyer bozukluğu olur ve akabinde ödem oluşmaktadır. Travmayı takiben oluşan SOR, ödemli beyin hücrelerinde hücre içi Ca^{+2} artışının bir sonucudur. Buna ilaveten, hücre içi Ca^{+2} artışı NOS ve ksantin oksidaz enzimlerini aktive etmekte ve böylelikle de serbest radikal üretimi ve NO artmaktadır. Oksijen radikallerinin NO ile birleşmesi toksik bir ürün olan peroksinitritin oluşmasına sebep olur. Aşırı Ca^{+2} birikmesi nörotoksisite ile sonuçlanan birçok stoplazma ve nükleer olayın başlamasına katkı sağlar. Ca^{+2} 'un hücre içerisindeki yeri ve akışı bu olayda son derece kritik bir rol oynamaktadır. Hücre içine Ca^{+2} geniş bir enzim serisini aktive eder ve nöronların hasarlanmasına yol açar. Bu enzimler serisinde protein kinaz C, fosfolipazlar, proteazlar ve NOS vardır. Travma, beyinde glutamatın hücre dışı konsantrasyonunda da artışa neden olmaktadır. Glutamat hasar görmüş nöron ve astrositlerden hücre dışı sıvıya boşalmaktadır. Hücresel enerji depolarının seviyesinin düşmesi ve membran proteinlerindeki oksidatif hasar osmotik hücre ölümlerine neden olur. Travmatik beyin hasarından sonra hücre dışı glutamat seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Artan bu yüksek glutamat seviyesinin, travmatik beyin hasarından sonra sekonder iskemik beyin hasarına ve intrakraniyal basıncın artmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Oksidatif stres sırasında meydana gelen serbest radikaller O_2^- ve NO dur (38-40).

4.5 Yangı ve Travmatik Beyin Hasarı

Diğer organlarda olduğu gibi beyinde de iskemi ve reperfüzyon, ilk doku hasarı düzeylerini kötüleştirebilen bir enflamatuar yanıtı yol açmaktadır. İntraselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) enfarktüs merkezinde ve enfarktüs çevresindeki damarlar tarafından üretilmektedir (49). ICAM-1 mRNA'sı ve endotel lökosit adezyon molekülü-1 (ELAM-1) ve selektin iskemiden sırasıyla 3 ve 6 saat sonra indüklenmektedir ve 6 ila 12. saatte pik düzeyine ulaşmaktadır (50). ICAM-1 proteini esas olarak enfarktüs merkezinde endotel hücrelerinde eksprese edilmektedir (51) ve iskemik dokuya nötrofil invazyonunda görev almaktadır. Sitokin tarafından indüklenen nötrofil kemo-atraktant protein de esasen enfarktüs içinde ve kenarlarında indüklenmektedir (52). CD11 pozitif

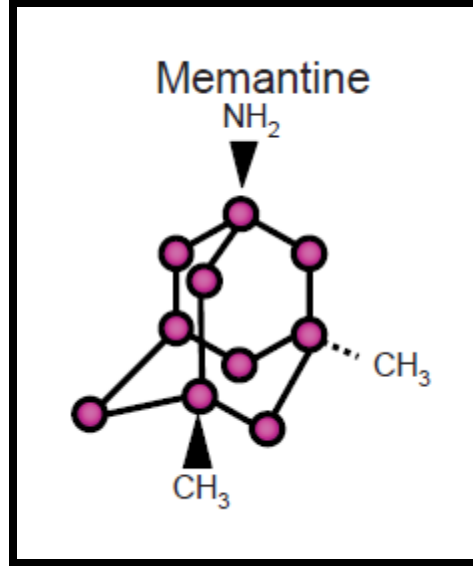
nötrofiller enfarktüs alanında bir gün içinde ortaya çıkmaktadır ve 3 gün içinde sayıları artmaktadır (53). Enflamatuar hücrelerde azalmanın veya adezyon molekülleri inhibisyonunun deneysel inme modellerinde hasarı azalttığını gösteren pek çok çalışma, adezyon molekülleri ve enflamatuar hücrelerin fokal iskemik beyin hasarında rol oynadığına işaret etmektedir (50, 57).

4.6 Apoptoz / Nekroz ve Travmatik Beyin Hasarı

Apoptoz, bir dizi farklı morfolojik ve biyokimyasal değişimlerle karakterize edilen ve farklı hücrelerde ortak bir yürütme mekanizmasının bulunduğu işaret eden bir hücre ölümü formudur. Klasik olarak, apoptotik hücrelerin fark edilmesi ve fagositozuyla sonuçlanan çekirdek kromatinin yoğunlaşması ve parçalarına ayrılması, sitoplazmik organellerin kompakt bir hale gelmesi, hücre hacminde azalma ve plazma membranında değişiklikler gözlenmektedir. Çekirdek değişimleri sıklıkla DNA'nın nükleozomlar arasından kesilmesiyle ilişkilendirilmektedir ve geleneksel agaroz jel elektroforezinde DNA'nın merdiven şeklini alması olarak tanınmaktadır. DNA'nın nükleozom yapıları arasından kesilmesi, apoptotik süreçte görece geç gerçekleşen bir olaydır ve bazı nöronal hücre ölümü modellerinde erken kritik adımlardan farklılık gösterebilir. Gerçekten de apoptoz, çekirdeği bulunan hücrelerle sınırlı değildir. Ancak yine de, DNA'nın parçalarına ayrılmasının fark edilmesi basit bir işlemdir ve sıklıkla bir hücrenin apoptoz nedeniyle ölüp ölmediğini saptamak için bir kriter olarak kullanılmaktadır (58, 59).

4.7 Memantin

Memantin (1-amino-3,5-dimetil-adamantane), Amerika ve Avrupada orta şiddetli Alzhemier hastalığının tedavisinde kabul görmüş bir NMDA reseptör antagonistidir (60-62). NMDA reseptörleri, daha az yaygın olan AMPA reseptörleri ve çoğunlukla Ca^{+2} dan oluşan katyonların girişine izin veren kainat reseptörleriyle beraber sinir sisteminde temel glutamat kapılı iyon kanallarıdır (63). NMDA-tip glutamat reseptörleri, bu reseptörlerin aşırı aktivasyonu olan ekzitotoksisteye sahip birçok kronik ve akut nörolojik hastalıkta son derece önemlidir ve hücrel hasarın ilerlemesinin bir faktörüdür.



Şekil 2. Memantinin kimyasal yapısı

Önceki girişimlerde, birçok NMDA antagonisti istenmeyen yan etkileri sebebiyle klinik çalışmalarda başarısız olmuştur. NMDA antagonistlerinin yan etkileri özellikle NMDA'nın fonksiyonel görevlere sahip olduğu fizyolojinin otonom kontrolleri üzerine istenmeyen etkileri nedeniyledir. NMDA antagonistlerinin glutamat reseptörlerinin fizyolojik ve patofizyolojik aktivasyonu arasında ayrım gösterememesi, memantinin yeni bir antagonist olarak keşfedilmesine kadar NMDA antagonistleri kavramının gözardı edilmesine neden olmuştur. Reseptör kanalını voltaja bağlı olarak bloklaması, orta derecede afinitesi ve hızlı açılış/kapanış kinetikleri gibi özellikler memantinin diğer NMDA antagonistlerinden ayrılmasını sağlayan ve istenmeyen yan etkilerini azaltan özellikleridir (60, 62, 64).

4.8 Melatonin

Melatonin ilk olarak 1958 yılında Aeron Lerner tarafından sığır epifiz bezinden izole edilen ve N-asetil-5-metoksitriptamin olarak adlandırılan bir moleküldür (65). Basit bir açıdan bakıldığında melatonin epifiz bezinden salgılanan ve etkilerini kan yoluyla vücuda dağıtan bir hormondur. Geceleri yüksek-plazma düzeyleri, gündüzleri ise düşük plazma düzeyine sahip olan melatonin hormonu karalık sinyal molekülü olarak tanımlanmaktadır (65,66). Melatoninin ritmik üretimi karanlık ve aydınlık ortam koşullarına bağlı olarak melatoninin plazma konsantrasyonları günün zamanı hakkında bilgi verebilir. Pineal bezden salgılanan melatoninin bu benzersiz 24 saatlik döngüsü mükemmler bir sirkadyen ritm örneğidir. Dahası melatoninin çeşitli dokulara taşınması, melatoninin diğer dokularda da sirkadyen sinyal ritme katılması mantıklı bir düşüncedir.

Günün zamanı hakkında bilgi vermesinin yanında, plazma melatonin konsantrasyonları da yılın zamanı hakkında bazı dokular tarafından kışları geceler uzun ve yazları kısa olacağı şeklinde yorumlanabilir (67).

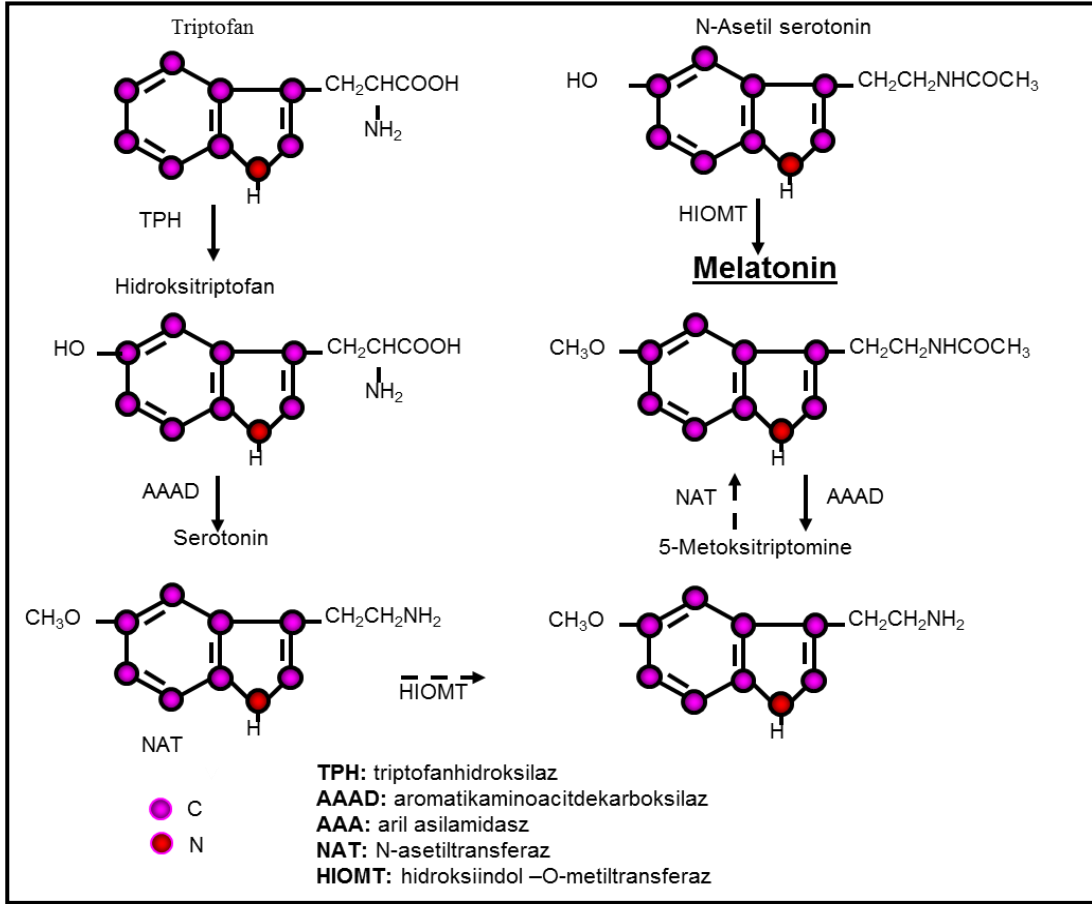
Melatonin hakkındaki çalışmaların çoğu memeli türlerinde yapılmış olmasına rağmen birçok hayvan türünde melatonin varlığı gösterilmiştir (68). Ayrıca melatoninin bitkiler tarafından üretilen ve bitkilerin köklerinde, yapraklarında, tohumlarında bulunduğu gösterilmiştir (69). Melatoninin bitkiler ve tek hücreli organizmalarda bulunmasına rağmen, bu organizmalardaki melatonin üretiminin karanlık ve aydınlık sinyallerden bağımsız olduğu görülmektedir (70).

Pineal bezden melatonin sirkadyen üretimi, hipotalamusun suprakiazmatik nukleus (SCN) tarafından düzenlenir. SCN, uyku-uyanıklık, sıcaklık, yeme-içme gibi sirkadyen döngüleri düzenleyen vücudun endojen biyolojik saat merkezidir. Dış ortamdaki ışık hakkındaki bilgi retinadaki retina gangliyon hücrelerinde bulunan özelleşmiş yapıdaki melanopsin reseptörü aracılığıyla SCN tarafından alınır. Karanlık-aydınlık hakkındaki bilgi SCN tarafından yorumlandıktan sonra melatoninin sentez komutu superior servikal gangliyon tarafından epifiz bezine gönderilir (65, 70, 71). Pineal bezin aktivitesini kontrol etmek amacıyla kullanılan birincil nörotransmitter madde norepinefrindir. Sinir terminallerinden salınan norepinefrin pineal bezdeki melatonin üretiminden sorumlu tip II pinealosit hücrelerindeki β -adrenerjik reseptörlere bağlanarak, melatonin üretimi için gerekli olan enzimlerin ekspresyonuna neden olur. Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamine) L-triptofandan üretilen ve bir nörotransmitter olan serotonin (5-hidroksitriptamine) tarafından sentezlenir. Triptofan triptofan hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksi-L-triptofana dönüştürülür ve daha sonra 5-hidroksi-L-triptofan aromatik L-amino asit dekarboksilaz enzimi ile seratonine dönüştürülür. Serotonin sentezlendikten sonra melatonin iki adımlı yoldan oluşur. İlk olarak serotonin arilalkilamine N-asetiltransferaz ile N-asetilserotonine asetile edilir. Bu adım serotoninin melatonin sentezinde sınırlayıcı adım oranıdır. Daha sonra, son olarak N-asetilserotonin melatonin üretmek için hidroksiindol O-metil transferaz enzimi ile metile edilir (66, 72). Melatonin sirkülasyonu öncelikle karaciğer tarafından katalize edilir. Melatonin ilk olarak karaciğerde 6-hidroksimelatonine hidroksile edilir ve birincil sulfat eşleniği olarak atılır (65, 70).

Melatonin genel olarak pineal bezin öncelikli ürünü olarak kabul edilir fakat melatonin üretilen tek yer pineal bez değildir. Melatonin otokrin ve parakrin fonksiyonları uygulamak için vücudun bazı bölgelerinden de sentezlenebilir. Gastrointestinal sistem (GI) (73), deri (74), kemik iliği (75), retina (76), lenfositler ve trombositler (77) memelilerde pineal bez dışında melatonin üreten vücut bölümleridir. Ancak bu sistemlerden üretilen melatonin plazma melatonin seviyesine önemli bir katkısı yoktur (73).

Melatonin sirküle olan bir hormon olmasına rağmen beyin-omurilik sıvısındaki (BOS) konsantrasyonu özellikle gece boyunca melatoninin plazma seviyesinden biraz daha yüksektir. Koyunlarda, melatonin pineal bezden pineal girinti aracılığıyla üçüncü ventriküle geçer ve dolayısıyla BOS içine geçer. İnsan ve koyunlarda pineal bez ve pineal girinti çevresindeki yapılar birbirlerine çok benzediği için BOS melatonin konsantrasyonu ile plazma melatonin konsantrasyonu karşılaştırıldığında insanlarda daha yüksek olduğu kabul edilebilir (78, 79).

Melatonin karanlık sinyal molekülü ve vücut için günlük ve mevsimlik ritimlerin genel bir eşzamanlayıcısı olmasının yanı sıra çeşitli fonksiyonlarının olduğu bildirilmiştir. Bunlar arasında en önemli olanı melatoninin bir antioksidan molekül olmasıdır (80, 81). Ayrıca melatoninin onkostatik (82) ve immunomodülatör (83) özelliklerinin olduğu gösterilmiştir.



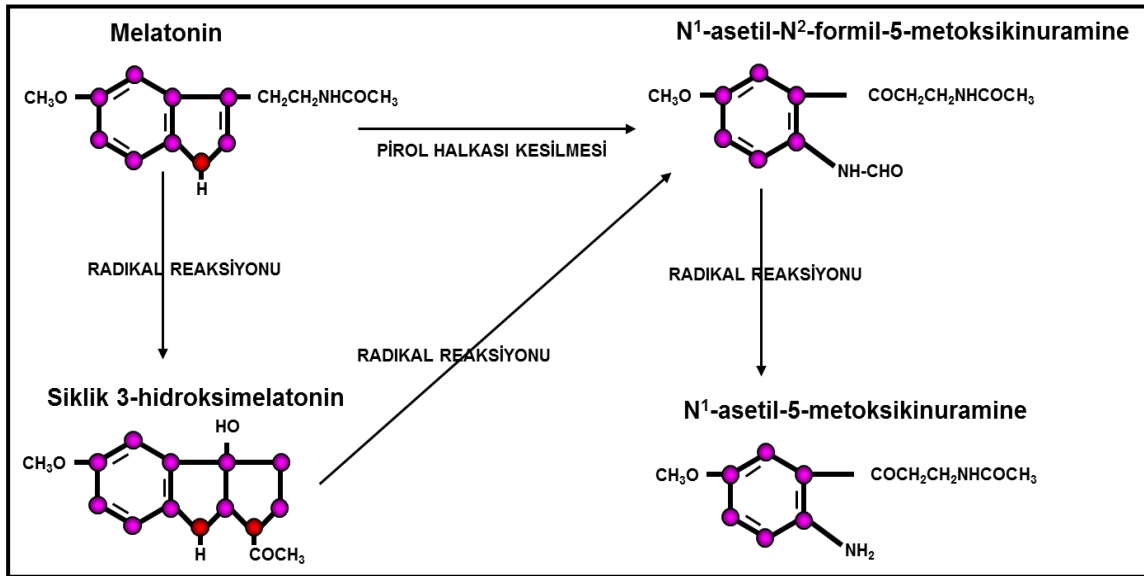
Şekil 3. Serotonin aracılığıyla triptofandan melatonin sentezi. Triptofan, triptofan hidroksilaz ve aromatik amino asit dekarboksilaz enzimleri aracılığıyla serotonine dönüşür, serotoninde N-asetil transferaz ve 5-hidroksiindol O-metiltransferaz enzimleri aracılığıyla melatonine dönüşür.

4.8.1 Antioksidatif Ajan Olarak Melatonin

Melatoninin bir sinyal molekülü olmasının yanında, reaktif oksijen türlerinin (ROT) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNT) tehlikeli etkilerini nötralize eden önemli bir ajandır. Melatonin, antioksidatif kapasiteyi dolaylı serbest radikal temizleme yoluyla ölçmenin doğal bir referans molekülü sayılan E vitamininden çok daha güçlüdür. Melatoninin bu yüksek antioksidan kapasitesi ROT ve RNT ile olan reaksiyonundan ve bazı antioksidan kapasitesine sahip doğal metabolitlerden meydana gelmektedir. Ayrıca, melatonin diğer antioksidan ajanlar gibi direk serbest radikal giderici bir ajan değildir. Antioksidan enzimlerin ekspresyonunu indükleyen ve pro-oksidatif enzimleri inhibe eden bir moleküldür. Melatoninin hücrede serbest radikal giderici enzimlerin, mitokondriyal ve SOD, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz enzimlerinin

düzeylerini artırdığı gösterilmiştir. Ek olarak melatonin hücre ölümünde rol oynayan indüklenebilir NOS ve 5- ve 12-lipoksijenaz düzeylerini düşürmektedir (80, 84, 85).

Melatonin, OH⁻, karbon trioksit (CO₃⁻), O₂⁻, NO, nitrojen dioksit (NO₂) ve peroksinitrit (ONOO⁻) moleküllerini direk olarak giderebilir. ROT / RNT reaksiyonları ve bazı enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar ile melatonin siklik 3-hidroksimelatonin ve kinuraminin türevleri olan N¹-asetil-N²-formil-5-metoksikinuramin (AFMK) ve N¹-asetil-5-metoksikinuramin'e (AMK) dönüştürülebilir. AFMK ve AMK'nın antioksidan moleküller olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, melatonin ve metaboliti AMK de mitokondride ilk olarak serbest radikallerin oluşmasını önleyen ve adenosin trifosfat (ATP) üretiminin etkinliğini arttıran tek-elektron transferi reaksiyonlarında bir elektron alıcısı olarak görev yapmaktadır. (70, 80, 84,85).



Şekil 4. Antioksidan olarak melatonin metabolitleri. Siklik 3-hidroksi-melatonin, AFMK ve AMK olmak üzere melatonin 3 adet metaboliti bulunmaktadır.

4.8.2 Melatoninin Hidrojen Peroksit ile İlişkisi

H₂O₂ hücrelerde katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler ile toksik olmayan ürünlere dönüştürülür. Glutatyon peroksidaz aktivitesi melatonin ile uyarılmaktadır (86). Bu nedenle, melatonin intraselüler H₂O₂ seviyesini azaltmaktadır. İndirgenmiş glutatyon oksitlenerek okside glutatyona, bu da diğer bir antioksidan enzim olan glutatyon redüktaz ile tekrar indirgenmiş glutatyona dönüşür. Glutatyon redüktaz aktivitesi de melatonin ile uyarılmaktadır. Glutatyon redüktaz aktivitesinde bir ko-faktör görevi yapan NADPH, glukoz-6-fosfat (G-6PD) dehidrogenaz ile oluşturulur. G-6PD aktivitesi

de melatonin ile uyarılmaktadır. Bu üç enzim direk veya indirek etkileri ile H_2O_2 'in toksik olmayan metabolitlere çevrilmesinde rol oynarlar. Son yapılan çalışmalar melatoninin H_2O_2 'in uzaklaştırılmasında az da olsa etkisi olan katalaz aktivitesini uyardığına işaret etmektedir (87-90).

4.8.3 Melatoninin Hidroksil Radikali ile İlişkisi

Tan ve arkadaşları glutatyon ve mannitolün $OH^\cdot$ radikalini giderme özellikleri ile karşılaştırıldığında, melatoninin diğer ikisinden çok daha iyi olduğunu belirlemişlerdir (86). İndol nükleusunun yan zincirindeki metoksi ve yan zincirindeki asetil, $OH^\cdot$ radikalini giderilmesinde rol oynarlar. $OH^\cdot$ radikalini giderilmesinde melatoninin elektron vererek etkisini gösterdiğine inanılmaktadır. Bunun sonunda da melatonin indolil (melatonil) katyon radikaline dönüşür. İndolil katyon radikali ise süperoksitin giderilmesinde rol oynar (89-91).

4.8.4 Melatoninin Singlet Oksijen ile İlişkisi

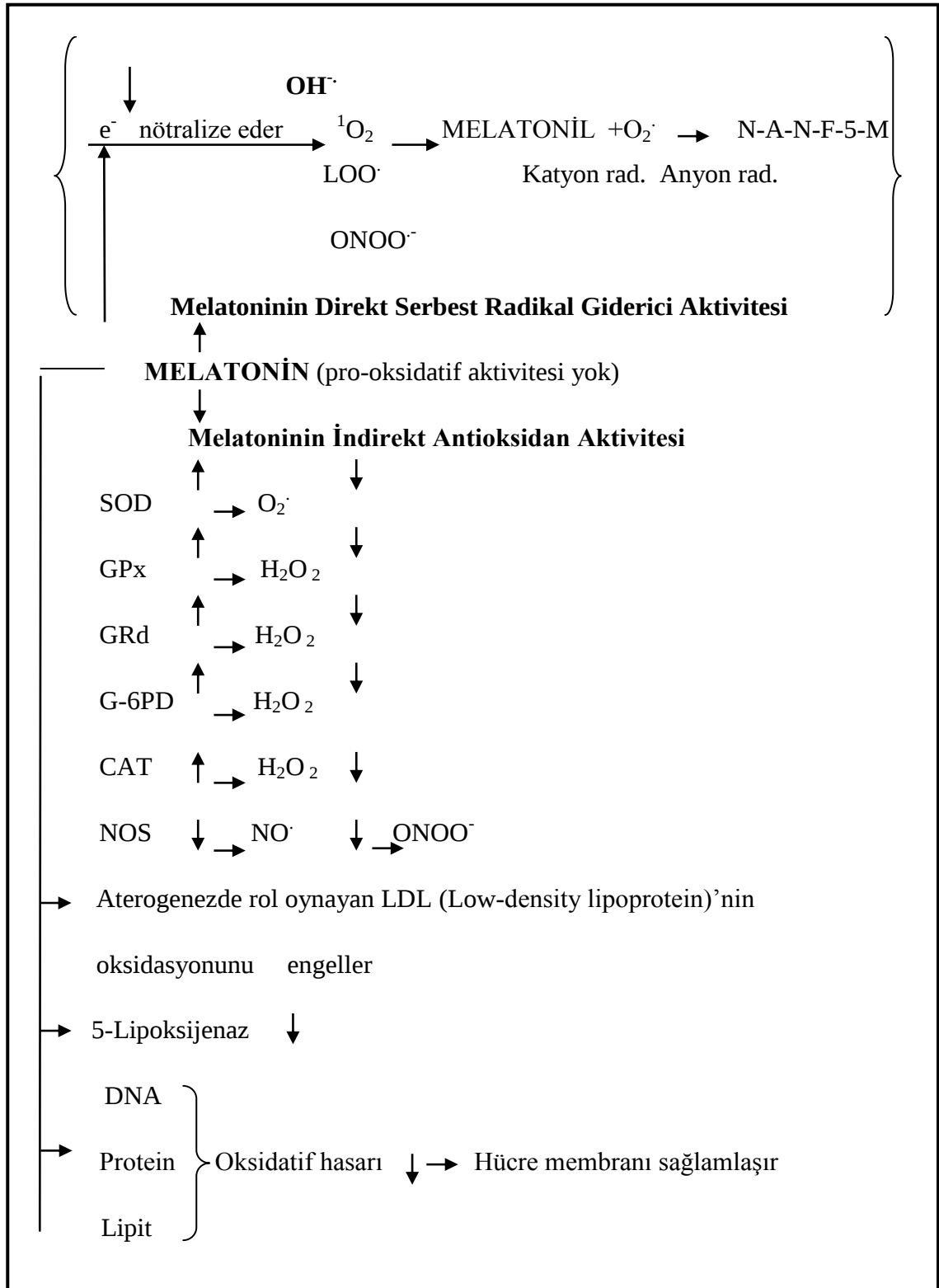
Melatoninin 1O_2 giderdiğini gösteren çalışmalar vardır. Melatoninin 1O_2 in nörotoksik etkisini tersine çevirdiği gösterilmiştir. Melatonin, direk olarak singlet oksijeni nötralize etmektedir (89,90,92).

4.8.5 Melatoninin Peroksil Radikali ile İlişkisi

$LOO^\cdot$ lipid peroksidasyonun başlamasında rol oynadığından oldukça toksiktir. Melatoninin peroksil radikalini giderdiği düşünülmektedir. Melatoninin bu etkisi vitamin E, Vitamin C, GSH ve mannitolünkinden daha güçlüdür. Melatonin lipid peroksidasyon üzerine olan engelleyici etkisi, peroksil radikalini giderilmesi ile birliktedir (89, 90, 93).

4.8.6 Melatonin Nitrik Oksit ve Peroksi Nitrit ile İlişkisi

$NO^\cdot$ tek başına aşırı bir toksisiteye sahip değildir, fakat $O_2^\cdot$ ile birleştiğinde makromoleküller için zararlı olan $ONOO^-$ 'a dönüşmektedir. Bu nedenle, nitrik oksit sentaz enzimi pro-oksidatif bir enzimdir. Fizyolojik dozdaki melatoninin serebellar ve hipotalamik NOS aktivitesini önlediği gösterilmiştir (89, 94). Bu etkisini L-arginin ile aktive olan cGMP oluşumunu azaltarak yapmaktadır (95). Melatonin direkt antioksidan etkisi sırasında nonenzimatik olarak parçalanır ve toksik etkisi yok denecek kadar az olan indolil katyon radikaline dönüşür. Bu da süperoksit radikalini yakalayarak hızla okside olur ve N-asetil-N-formil-5-metoksikinuramine çevrilir (89, 96).



Şekil 5. Melatoninin serbest radikallerin giderilmesinde rolü. $LOO^{\cdot}$: Peroksil radikali, N-A-N-F-5-M: N-asetil-N-formil-5-metoksikinuramine, G-6PD: Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, GPx: Glutasyon peroksidaz GRd: Glutasyon redüktaz.

4.8.7 Melatonin Reseptörleri ve Etkileşimde Olduğu Proteinler

Melatoninin Mel_{1a}, Mel_{1b} ve Mel_{1c} olmak üzere üç tip reseptörü bulunmaktadır. Mel_{1a} reseptör geni insan kromozomunda 4q35.1 lokalizasyonunda kodlanmıştır. Sirkadyen ve reproduktif etkilerinin bu reseptör aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. Mel_{1b} beyin ve retinada eksprese olur ve bu iki bölgede dopaminerjik fonksiyonlar ile ilişkisinin bulunduğu düşünülmektedir. Mel_{1c} ise insanlarda bulunmamaktadır. Mel_{1a}, ve Mel_{1b} günümüzde MT₁ ve MT₂ olarak bilinmektedir. MT₁, melatonin reseptörü çalışmalarında kullanılan radiolabel 2-¹²⁵I-melatonine karşı MT₂'ye kıyasla pikomol bölgesinde biraz daha yüksek bir afiniteye sahiptir ancak her iki reseptör de 25-160 pM arasında değişen K_D değerleriyle birlikte benzer bir farmakolojik profil sergilemektedir (97,99).

Önceleri MT₃ olarak bilinen ve kinon redüktaz 2 enzimi olarak adlandırılan bir başka reseptör daha bulunmaktadır (98,99). Dahası melatoninin küçük ve lipofilik yapısı onu kolayca hücre membranından ve kan-beyin bariyeri gibi biyolojik membranlardan kolayca geçirebilir.

Bu nedenle, retinoid ile ilişkili orfan nükleer hormone reseptörü RZR/ROR α süper ailesinin doğal bir ligandıdır. Bu aile üyeleri arasında ROR α 1 ve ROR α 2 immün hücrelerinde fonksiyonel intraselüler melatonin reseptörleri olabilir, oysa RZR β merkezi sinir sistemindeki (MSS) reseptör olabilir (68, 98, 99).

Ayrıca melatoninin kalretikülin, laşmodulin ve tubulin gibi hücre içi proteinlerle etkileşimde olduğu gösterilmiştir (61, 68, 99). GPR50'nin insan MT₁ ve MT₂ reseptörleriyle %45 homolojiye sahip bir orfan G-protein bağlantılı bir reseptör olduğu ancak MT₁ ve MT₂ ile etkileşime girdiği gösterilmesine karşın GRP50'nin melatonine bağlanmadığı unutulmamalıdır (100).

MT₁ ve MT₂ melatonin reseptörleri, SCN, pars tuberalis, hipokampus, serebellum ve MSS'de ki çeşitli bölgelerde, ventrikül duvarları, koroner arterler, serebral arterler, aort, ve kardiyovasküler sistemdeki diğer arterler, prostat, göğüs, yumurtalık hücreleri, safra kesesi, duodenum, deri, çeşitli bağışıklık hücreleri, adiposit ve diğer bir çok doku ve hücre tipinde çeşitli fizyolojik etkiler göstermek üzere buralarda eksprese edilmektedir (98, 99).

4.9 Deneyisel Kafa Travma Modelleri

Travmatik beyin hasarında hayvan modellerinin amacı patofizyolojik incelemeler veya tedavi seçeneklerinin tekrarlanabilir bir şekilde yapılmasını sağlamaktır (101). Yapılacak araştırma hipotezindeki beklentilere bağlı olarak model seçimi yapılmaktadır. Geçmiş yıllardaki araştırmalarda kullanılan travma modelleri, beyin hasarının biyomekanik incelenmesinde yeterli olurken, günümüzde kullanılan modeller moleküler düzeyde incelemelere imkan verecek şekilde dizayn edilmektedir (102,103). Seçilen modelin yapılacak çalışmaya göre; a) hasarı indüklemek için kullanılan mekanik kuvvet kontrollü, tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmasına; b) yapılan hasarın insanda gözlemlenen travmatik hasara benzerlik göstermesine; c) hasar sonucu fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal veya davranışsal parametrelerin hasara neden olan mekanik kuvvet ile orantılı olmasına ve d) uygulanan mekanik kuvvetin oluşturabileceği patofizyolojik bozuklukların tahmin edilebilir olmasına dikkat edilmektedir (104).

Deneyisel travmatik beyin hasarı modellerinde farklı sınıflandırmalar yapılmıştır. Buna öncülük eden çalışmada ivmeli sarsıntı ve perküsyon sarsıntısı olmak üzere deneyisel beyin hasarını iki büyük grupta toplanmıştır (105). Daha sonra yapılan sınıflandırmalarda bu çalışma temel olarak alınmıştır (106).

Kafa travma modelleri genel hatlarıyla mekanik kuvvetin şiddetine, süresine, hızına ve ivmelenmesine bağlı olarak statik ve dinamik olmak üzere iki gruba ayrılır. Statik modeller morfolojik ve fonksiyonel süreçlere odaklanır ve kuvvetin şiddeti ve süresi önemlidir. Kraniyal sinirin pens ile ezilmesi MSS hasar modeli olarak örnek verilebilir. Mekanik kuvvette şiddet, süre, hız ve ivmenin hepsi birden bir arada olduğu grup ise dinamik modellerdir. Dinamik modeller de indirek ve direk olmak üzere ikiye ayrılır. Dinamik direk modellerde yine kendi içinde ikiye ayrılarak vuruşlu ve vuruşsuz olarak ikiye ayrılmaktadır.

Kafa hareketliliği baz alınarak yapılan model sınıflandırmasında literatürde en çok kullanılan modeller arasında ağırlık düşürme, sıvı darbeli hasar, korteks kontrollü vuruş sayılabilir. Sıvı darbeli model genellikle patoloji, fizyoloji ve farmakoloji çalışmaları için uygundur. Çalışılan tür açısından sıçan, fare, kedi, tavşan gibi geniş bir denek alanına sahiptir. Sıvı darbeli model direk olarak dura üzerine bir basınç uygulayarak hasar meydana getirmektedir. Ağırlık düşürme modelleri de en yaygın kullanılan modellerden biridir. Düzeneğe sabitlenen hayvanın ya direk kafatasına ya da vuruş

yapılacak kısımdaki kafatası kemiğindeki kısım kaldırılarak direk beyin üzerine belirli bir yükseklikten ağırlık düşürülerek yapılmaktadır. Histopatolojik olarak nöronlarda, aksonlarda, dendritlerde ve mikrodolaşımda yaygın bir hasar görülmektedir. Ayrıca bu modelde şiddetli yaygın diffüz aksonal hasar, ödem gibi beyine ciddi hasar veren patofizyolojik süreçler çalışılabilmektedir. Ağırlık düşürme modelleri özellikle sıçanlarda, köpeklerde ve domuzlara uygulanmaktadır (107).

Travmatik beyin hasarının patofizyolojisi ele alındığında NMDA reseptörünün eksitotoksitesitesi ve serbest radikal üretimi sonrasında oluşan hücre ölüm süreçlerinin oluşan hasarın oluşumunda başlıca rol oynadıkları görülmektedir. Bu nedenle bu çalışmada biri antioksidatif (melatonin) diğeri NMDA reseptör antagonisti (memantin) olan ve insanlarda bilinen yan etkileri bulunmayan bu iki ajanın travmatik beyin hasarı üzerine koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

5. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Deneylerde 200-250 gram ağırlığındaki Sprague-Dawley erkek sıçanlar kullanıldı. Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden sağlanan hayvanlar, kontrollü sıcaklık ($21 \pm 1^{\circ}\text{C}$) ve ışık (12 saat aydınlık / 12 saat karanlık) ortamında tutuldu. Sıçanlar standart pelet yem ve musluk suyu ile kısıtlamasız beslendi.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan hayvan grupları ve ilaç dozları: Çalışmada dört grup sıçan kullanıldı (n=9). Çalışmada tedavi amaçlı uygulanan memantin, melatonin dozları daha önce yapılan çalışmalar dikkate alınarak belirlendi.

Gruplar	Doz	İlaç uygulaması
Kontrol	% 5 Etanol içeren 150 μl izotonik tuzlu su	<i>i.p.</i> travma sonrası tek uygulama
Memantin	20 mg/kg	<i>i.p.</i> travma sonrası tek uygulama
Melatonin	4 mg/kg	<i>i.p.</i> travma sonrası tek uygulama
Memantin/melatonin kombinasyonu	20 mg/kg	<i>i.p.</i> travma sonrası tek uygulama
	4 mg/kg	<i>i.p.</i> travma sonrası tek uygulama

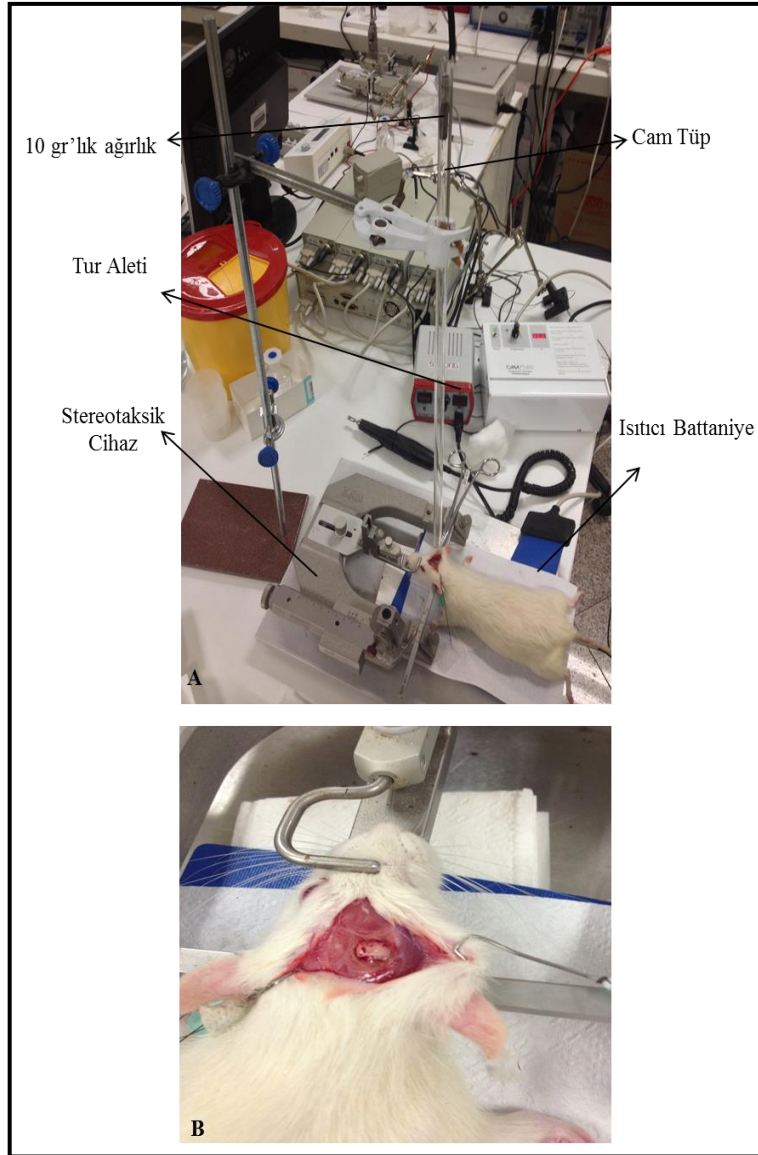
5.2 İlaç Hazırlanması ve Enjeksiyonu

Tedavi gruplarına: Memantin, melatonin ve melatonin/memantin ilaç kombinasyonu enjekte edildi. 50 mg memantin (Sigma 9292) 5 ml serum fizyolojik içerisinde çözülerek 20 mg/kg dozunda hayvan başına 500 μl intraperitoneal olarak enjekte edildi. 10 mg Melatonin (Sigma 5250) 250 μl etanol + 4,75 ml serum fizyolojik içinde çözülerek 4 mg/kg hedef dozunda hayvan başına 500 μl intraperitoneal olarak enjekte edildi. Kontrol grubuna 500 μl serum fizyolojik memantin ve %5 ETOH taşıyan 500 μl serum fizyolojik melatonin eritici olarak intraperitoneal yolla verildi.

5.1 Deneysel Travmatik Beyin Hasarı Modeli

Çalışmada Feeney ve arkadaşlarının 1981 yılında geliştirdiği künt kafa travma modeli modifiye edilerek kullanıldı (108). Sprague-Dawley cinsi erkek ratlar herbiri dokuz hayvan içeren dört gruba ayrıldı. Sıçanların anestezide alınması amacıyla rompun

(10 mg/kg) ve ketasol (100 mg/kg) anestezisi kullanıldı. Anestezi altına alınan sıçanlar stereotaksik cihaza yerleştirilmelerini takiben bregma noktası referans alınarak yaklaşık 1 cm sagittal düzlemde bir kesi sonrası kafatası kemiği ortaya çıkaldı. Dişçi turu kullanılarak sağ 2,5 mm lateral ve 2,5 mm posteriyor noktası merkez kabul edilerek 6 mm kemik parçası dairesel olarak eksine edildi ve beyin travması için hazırlandı. Kafatasına açılan bu kısma yine aynı çapta metal pul yerleştirilmesini takiben 10 gr'lık ağırlık 50 cm yükseklikten iç çapı 8 mm olan cam borudan serbest düşme ile beyin üzerine yerleştirilen pul hedef alınarak bırakıldı. Vuruşların ardından 5 dakika sonra ilaç enjeksiyonları yapıldı. Bu işlem sonrası deri dikilerek kapatıldı ve anesteziden çıkıncaya kadar homeotermik battaniye üzerinde bekletilerek kafeslerine geri konuldu (Şekil 6).



Şekil 6. Travmatik beyin hasarı deney modeli (A), travma sonrası beyin dokusu (B)

5.3.1 Cresyl Violet Boyaması

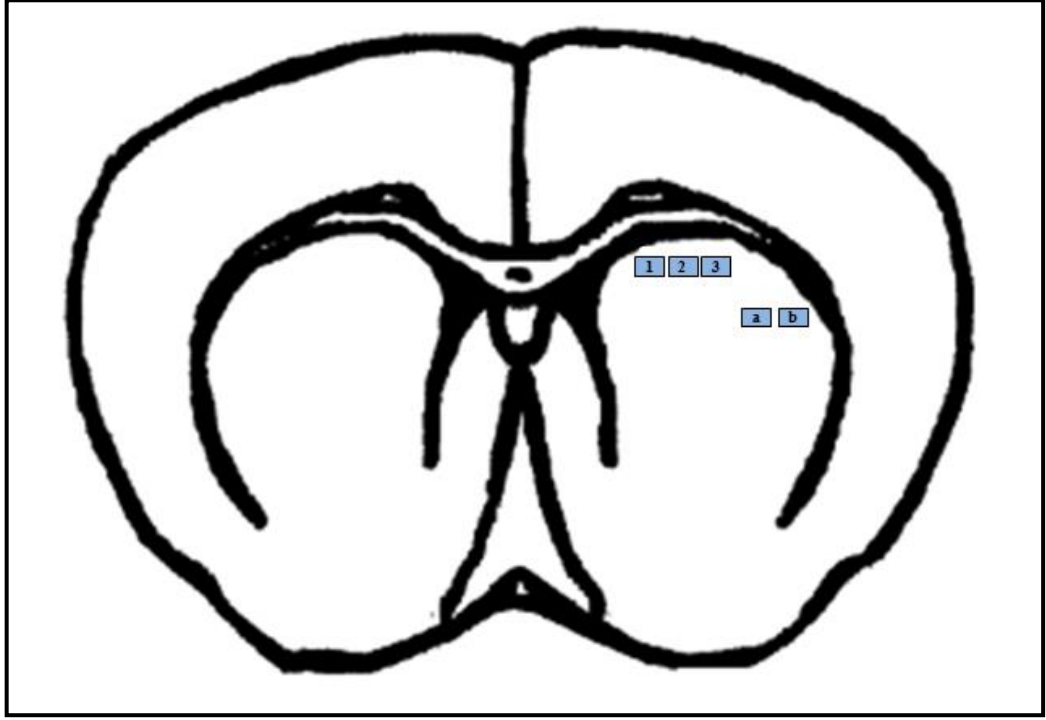
Cresyl violet beyindeki nöronların boyanmasında, nöronlar ve hücre çekirdeklerindeki nissl taneciklerini göstermek için kullanıldı. Bregma seviyesinden alınan 18 µm kalınlığındaki kesitler aşağıda belirtilen protokol çerçevesinde histolojik boyama prosedürleri kullanılarak cresyl violet boyaması yapıldı. Boyanan kesitlerden Image J programı (National Institute of Health, Bethesda) kullanılarak hasar alanı belirlendi.

5.3.1.1 Cresyl Violet Uygulaması

Alınan koronal kesitler 30 dakika süreyle 37 °C de kurutmaya alındı, şalelere yerleştirilen slaytlar 7 dakika PFA ile muamele edilip dH₂O ile yıkanıp şaleler değiştirildi. Çalkalayıcı kullanılarak 5 dakika PBS ile yıkanıp tekrar dH₂O ile yıkandı. Slaytlar 2 dakika masa üzerinde, 13 dakika çalkalayıcı üzerinde Cresyl Violete maruz bırakıldı. Slaytlar önceden hazırlanan ve sırasıyla %70, %90, %95, %100 (20-25 sn) alkol ile muamele edildip, 2 tane Xylene şalesi hazırlanarak 1. Şalede 2-3 dakika, 2. şalede ise 1-2 dakika bekletildi ve son olarak üzerlerine cam pastör pipet ile mounting medium damlatılarak kurutmaya bırakıldı.

5.3.2 TUNEL Boyaması

TUNEL DNA fregmantasyonunu göstermede kullanılan yaygın bir metottur. Apoptozun son evresindeki hücreleri tanımlamak için kullanıldı. Çalışmamızda beynin korpus kallozum bölgesinde belirlediğimiz alanlardan TUNEL + hücre sayımı yapıldı.



Şekil 7. Bregma seviyesinden alınan kesit bölgesi. Cresyl ve TUNEL boyamalarının yapıldığı beyin kesiti. (4. Seviye)

5.3.2.1 TUNEL Uygulaması

-80 °C'den alınan slaytlar oda sıcaklığında 30 dakika kurutuldu, slaylat şalelere alınıp PFA içerisinde 10 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda, 10 dakika +4°C de bekletildi. Slaytlar yeni şale ve şale yatağına alınıp 3 x 5 dakika çalkalayıcıda 80 RPM de PBS ile yıkandı, yeni bir şaleye P1 (Permeabilization Solution) konulup slayt yatağı değiştirildi, tekrar yeni bir şaleye P2 (Citrate Buffer) hazırlanıp, slaytlar P1 şalesinden alınıp P2 şalesine konuldu. Bir dakika boyunca 750 W da mikrodalgada P2 solusyonunda kaynatılıp, üzerine 80 ml dH₂O eklendi. Slaytlar hızlı bir şekilde PBS şalesine batırılıp çıkartıldı ve fazla su slaylat üzerinde atılarak daha önceden hazırlanan nemli ortama (Humidified Chamber) dizildi. Beyin dokusunun etrafı maddenin dışarıya akmaması için hidrofobik yapıdaki PAP-PEN ile çizildi. Örnek başına yaklaşık 50µl Buffer A (%2 BSA, %1 Gelatin, %10 NGS, %0,03 PBS-T) eklenerek çalkalayıcı üzerinde 80 RPM de 30 dakika inkübe edildi. Nemli ortamdan alınan slaylat şale yatağına dizilip 10 dakika 80 RPM de PBS ile çalkalanarak Roche In Situ Cell Detection Kit içerisinde hazır halde bulunan enzim 1: 50 µl + buffer 2: 550 µl karışımı buz içerisinde karanlıkta bekletildi ve örnek başına yaklaşık 30µl 1+2 eklenip üzerleri parafilm ile kapatıldı. Nemli ortamda 70 dakika 37 °C de etüvde inkübe edildi. Daha

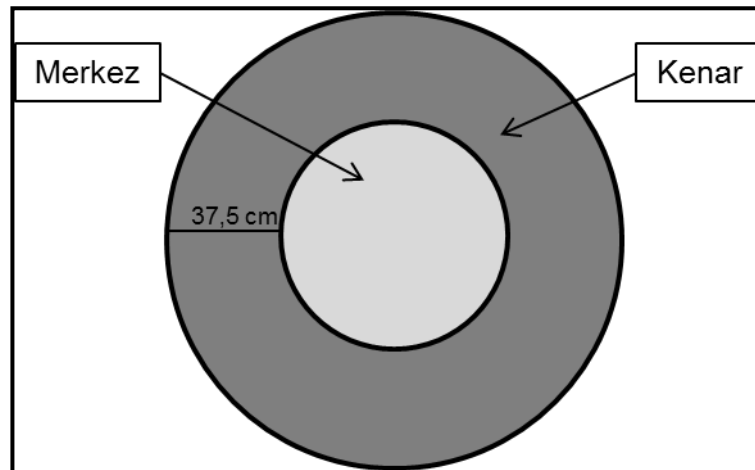
sonra yeni bir şaleye PBS konularak 3 x 5 dakika yıkama yapıldı. DAPI ile çekirdek boyaması yapılarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilip 5 dakika PBS ile yıkama yapıldı. Şaleden çıkarılan slaytlar peçete ile kurulanıp, üzerlerine Mounting Medium eklendi. Slaytlar uzun cover slip ile kapatılarak alüminyum folyo ile çevrili olan slayt kutularına kaldırıldı ve son olarak yaklaşık 45 dakika sonra cover slip etrafı ojeyle çevrilip, bir gece oda sıcaklığında kurutuldu. Şekil 7’de belirtilen bölgelerde hasar çevresi dikkate alınarak apoptotik hücre sayıları değerlendirildi.

5.4 Davranış Testi

Hayvanlara operasyon öncesi ve sonrası açık-alan davranış testi uygulandı.

5.4.1 Açık-Alan Testi

Bu test hayvanlardaki spontan hareket aktivitesini ve araştırma hareketlerini ölçmek için kullanıldı. Açık-alan testi çapı 150 cm, yüksekliği 35 cm olan kenarları ve duvarları polipropilenden, tabanı beyaz plastikten yapılan yuvarlak bir düzenekte yapıldı. Taban alanı kenar ve merkez olmak üzere iki farklı bölgeye ayrıldı. Testin başlangıcı esnasında hayvanlar alanın kenar kısmına bırakıldı ve hareketleri Ethovision 3 programı (Noldus Information Technology Wageningen) ile 10 dakika süreyle kamerayla izlendi. Ham data Wintrack 2.4 programına aktarıldı. Operasyon öncesi ve operasyon sonrası veriler birbiri ile karşılaştırılarak kenar ve merkezde harcadığı süre, hareketli ve hareketsiz kaldığı süre ve toplam katedilen mesafe ölçüldü.



Şekil 8. Açık-Alan testi

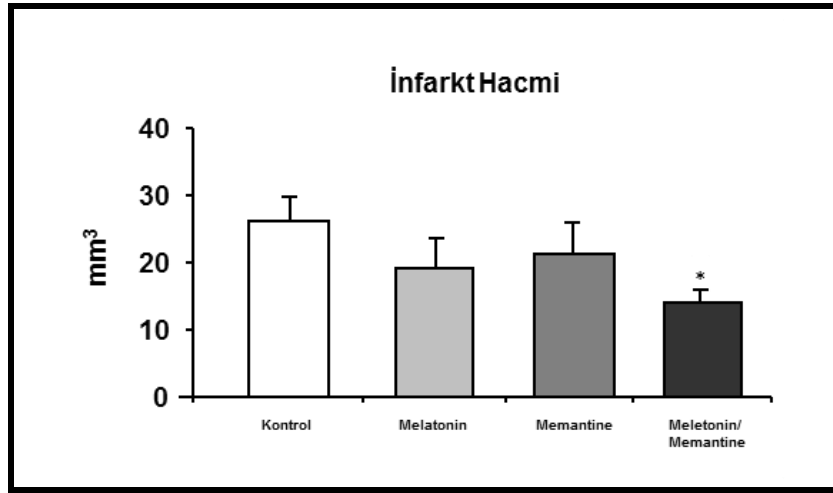
5.5. İstatistik

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS programı kullanıldı (SPSS Inc., IL). Gruplar arası farklılıklar tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanılarak hesaplandı. Bütün değerler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde analiz edildi. $P<0.05$ istatistik olarak anlamlı kabul edildi.

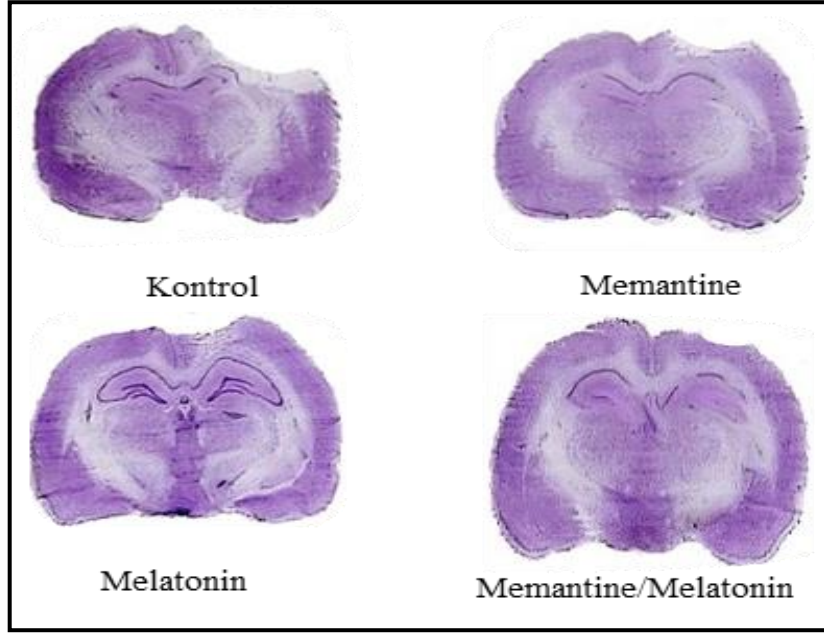
6. BULGULAR

6.1 Hasar Hacmi ve Alanı

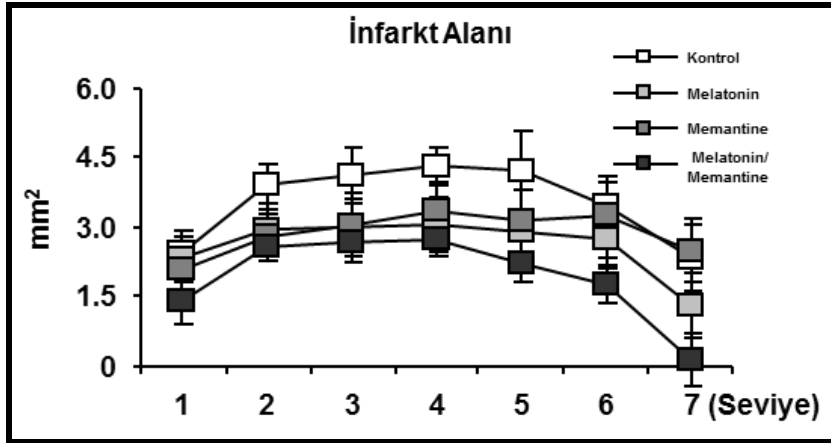
Kontrol grubu ve tedavi gruplarında hasar alanı ve hasar hacmi travmatik beyin hasarından 24 saat sonra ölçüldü. Kontrol grubu hasar hacmi $26 \pm 3.52 \text{ mm}^3$ olarak ölçüldü ve özellikle Memantin/melatonin kombinasyon grubunda hasar hacminde %50'ye yakın bir azalma gözlemlendi. Memantin grubunda $21 \pm 4 \text{ mm}^3$, melatonin grubunda $19 \pm 4 \text{ mm}^3$ ve $13 \pm 2 \text{ mm}^3$ memantin/melatonin kombinasyon grubu olarak ölçüldü. Memantin/melatonin kombinasyonu ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak ($p < 0.05$) anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Fakat tedavi gruplarının kendisi içerisinde anlamlı bir farklılık görülmedi (Şekil 9,10). Hasar alanında ise total beyinden alınan ve her biri 0.5 mm'lik 7 farklı seviyenin birbirleri arasında hasar alanı incelemesi yapıldı. Özellikle melatonin ve memantin/melatonin grubunda 4. ve 5. seviyede kontrole göre anlamlı farklılıklar görüldü (Şekil 11).



Şekil 9. Koronal kesitlerden hesaplanan hasar hacmi. Yapılan cresyl violet boyaması sonucu tedavi gruplarında, tedavi gruplarının kontrole göre hasar değişimi. Melatonin/Memantin kombinasyon grubu $13 \pm 2 \text{ mm}^3$ (* $p < 0.05$)



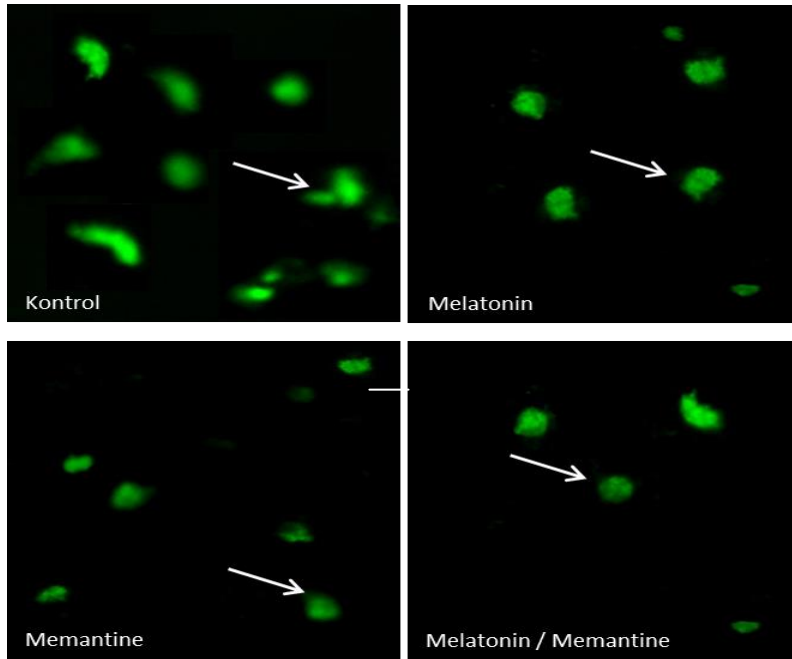
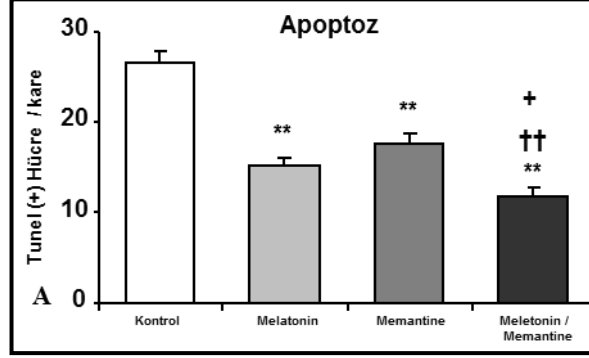
Şekil 10. Koronal kesitlerde cresyl violet boyaması



Şekil 11. Koronal kesitlerden hesaplanan hasar alanı. Hasar hacminin hesaplanması amacıyla 7 seviyeden 0.5 mm aralıklar ile alınan koronal beyin kesitleri kullanıldı. Kesitlerin alınmasında standart nokta olarak vuruşun yapıldığı merkez nokta olan bregmanın 2.5 mm posterioru dikkate alınarak bregma seviyesinden itibaren 0.5 mm'lik aralıklar ile 7 seviyeden kesitler alındı. Kesitler boyanarak alınarak cresyl violet boyaması sonrasında alan tespiti grafikte görüldüğü gibi 4. ve 5. seviyelerde melatonin ve memantin/melatonin kombinasyon grubu kontrole göre anlamlı bulundu. ($p < 0.05$).

6.2 Apoptoz

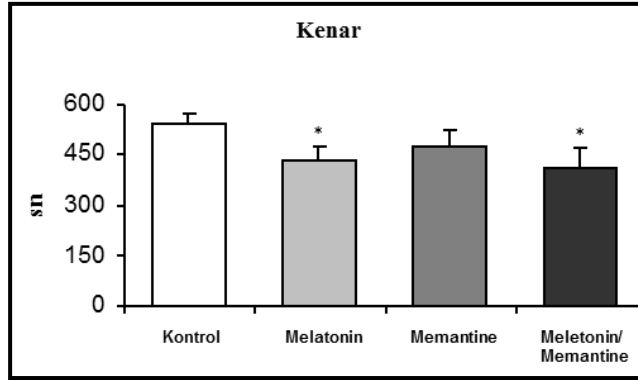
Bregma seviyesinden alınan kesitten Şekil 8 de gösterilen 1, 2, 3, a ve b bölgelerinden apoptotik hücre sayımı yapıldı. Şekil 12 de belirtildiği gibi bütün tedavi gruplarında %50 ye yakın apoptotik hücre azalması görüldü. Çalışmada yer alan tedavi grupları hem kontrolle hemde kendileri arasında anlamlı farklılıklar gösterdi ($p<0.05$).



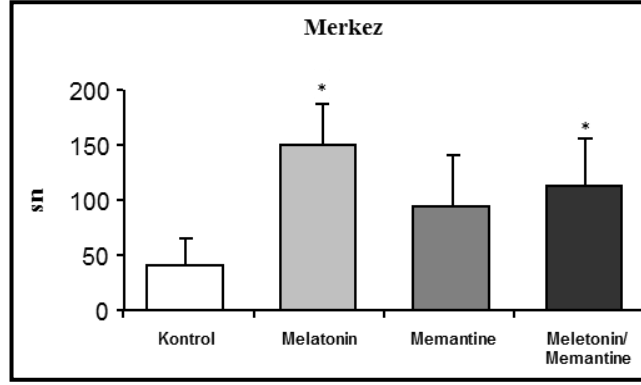
Şekil 12: Tunel (+) hücre sayısı. Alınan koronal kesitlerden 4. seviyede TUNEL boyaması yapıldı. Apoptotik hücre sayısı bazında bütün tedavi gruplarında hem kontrole göre hemde kendi aralarında anlamlı düşüşler görüldü. ** $p<0.01$ kontrol grubu ile; †† $p<0.01$ memantin grubu ile/† $p<0.05$ melatonin grubu ile yapılan istatistiksel karşılaştırmaları göstermektedir. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

6.3 Davranış Testi

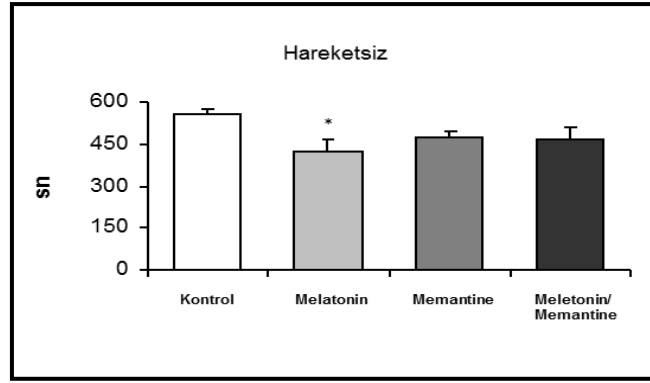
Yapılan açık-alan testinde sıçanlar 600 saniye süre ile kamera ile izlendi. Travma geçirmiş hayvanlar hasarın etkisi ile daha çok alanın kenar bölgesinde vakit harcama eğilimi içerisine girmektedirler. Fakat şekil 13 de görüldüğü gibi tedavi gruplarında kontrole (541 ± 27 sn) göre düşüş görüldü. Özellikle melatonin (436 ± 37 sn) ve memantin/melatonin (408 ± 61 sn) kombinasyonunda anlamı bir azalma görüldü. Bu durumun tam aksine travma sonrasında hayvanların merkez bölgesinde geçirdiği sürenin azalması gerekmektedir. Şekil 14 de görüldüğü üzere kontrole (40 ± 24 sn) göre tedavi gruplarında ve özellikle melatonin (149 ± 37 sn) memantin/melatonin (112 ± 44 sn) kombinasyon grubunda anlamlı bir artış görüldü.



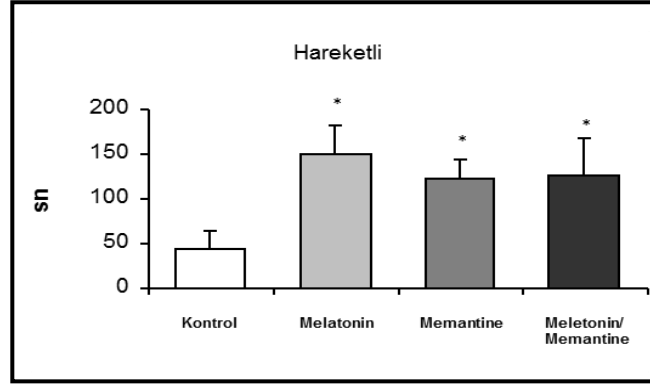
Şekil 13. Travma sonrası hayvanların kenar bölgesinde gezinme süreleri. Hayvanlar 600 saniye kaldıkları açık-alan testinde depresyona girip kenar bölgesinde kalmak yerine tedavinin etkisiyle kontrole göre kenar bölgesinde daha az süre kalmıştır. * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.



Şekil 14. Travma sonrası hayvanların merkez bölgesinde gezinme süreleri. Merkezde özellikle melatonin ve memantin/melatonin kombinasyon grubunda kontrole göre anlamlı artışlar görüldü * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.



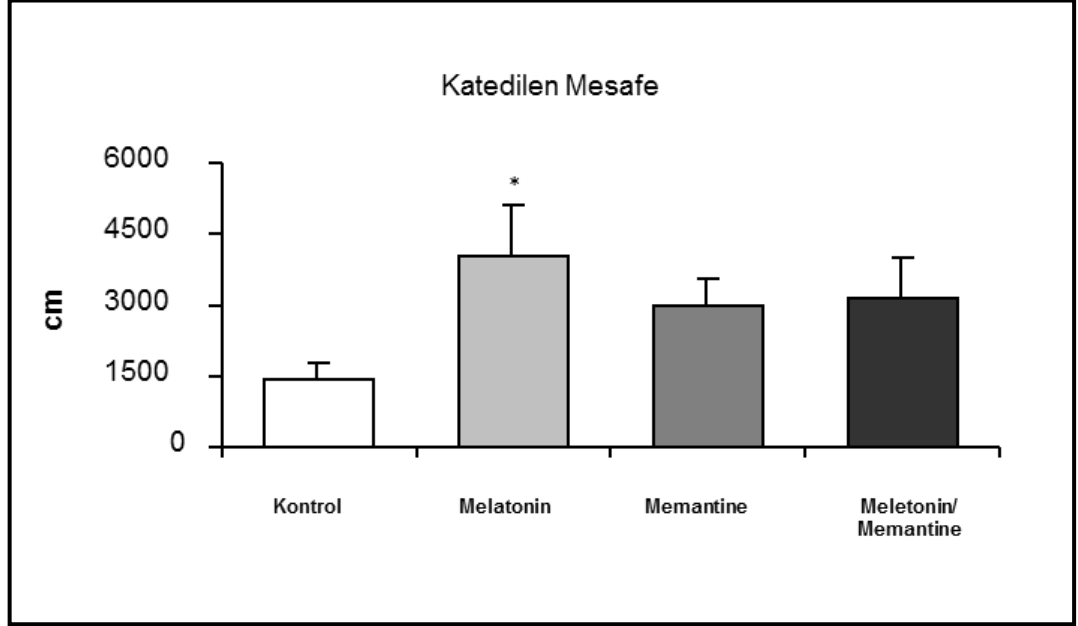
Şekil 15. Travma sonrası hayvanların açık-alan testinde hareketsiz kaldığı süre. Davranış testi sonrasında sıçanlarda hareketlilik süreleri incelendi. Yapılan analiz sonucunda bütün tedavi gruplarında hareketsiz kalma sürelerinin düştüğü görüldü. Fakat özellikle melatonin grubunda (426 $\pm$ 41sn) kontrole göre anlamlı bir azalma belirlendi. * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.



Şekil 16. Travma sonrası hayvanların açık-alan testinde hareketli olduğu süre. Travma geçirmiş bütün gruplarda beklenen hareketsizliğin aksine bütün tedavi gruplarında aksine bir durum görüldü. * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

Hareketlilik ve hareketsizlik bakımından incelendiğinde sıçanların depresif bir durum sergilemeleri beklenirken bu durumun tam aksi sonuçlar görüldü. Hareketsizlik parametresinde sıçanlar kontrole göre özellikle melatonin grubunda anlamlı azalmalar görüldü (Şekil 15). Hareketli olduğu sürede ise bütün tedavi gruplarında kontrole göre anlamlı düşüşler görüldü. Memantin (121 ± 22 sn) melatonin (150 ± 31 sn), ve memantin/melatonin kombinasyonu (126 ± 40 sn) (Şekil 16).

600 saniye süre ile her iki bölgede de (merkez + kenar) toplam katettikleri mesafe kaydedildi. Bütün tedavi gruplarında ve özellikle melatonin (4064 ± 1050 cm) grubunda kontrole göre anlamlı bir artış görüldü ($p < 0.05$).



Şekil 17. Travma sonrası grupların açık-alan testinde katettiği toplam mesafe. Kafa travması geçirmiş sıçanların daha pasif olmaları beklenirken 600 saniye süre ile sıçanların katettikleri toplam mesafe bütün tedavi gruplarında kontrole göre ve özellikle melatonin grubunda anlamlı artışlar görüldü. * $p < 0.05$ kontrol grubuna göre anlamlılığı ifade etmektedir. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Memantin ve melatonin beyin hasarı sonrası meydana gelen patofizyolojik süreçlerde sırasıyla ekstrasinaptik NMDAR üzerine inhibitör etki ve serbest radikal giderici rol oynarak nöronal hücre kaybını azaltmaktadır (109). Yaptığımız çalışmada sıçanlarda deneysel olarak geliştirilen travmatik beyin hasarı sonrasında davranış, histolojik yöntemler kullanılarak melatonin, memantin ve her ikisinin kombinasyonunun nöroprotektif etkileri incelendi. Bu çalışmada beyindeki nöronal hasarı incelemek amacıyla Feeney ve arkadaşlarının geliştirdiği deneysel travmatik beyin hasarını modeli modifiye edilerek uygulandı. Beyin hasarı ve uygulanan tedavilerin davranış ve özellikle hareketlilik üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla açık alan testi yapıldı. Beyindeki hasar hacminin ve hasar alan dağılımının belirlenmesi amacıyla cresyl violet boyama tekniğini kullanıldı. Apoptotik hücre ölümüne melatonin, memantin ve melatonin/memantin uygulamasının etkisinin araştırılması amacıyla TUNEL yöntemi kullanıldı. Çalışma sonucu elde edilen bulgularımız; melatonin, memantin ve özellikle bu moleküllerin kombinasyonlarının anlamlı olarak travmatik beyin hasarını ve apoptotik hücre ölümünü azalttığı göstermektedir. Bu bulgular, hasarın neden olduğu davranış bozukluklarındaki düzelme ile paralellik göstermektedirler.

Yapılan davranış testlerinde, melatoninin travmatik sıçanlarda depresyonun giderildiği, hiperaktivite ve anksiyeteyi azalttığı gösterilmiştir. Özellikle melatonin ve melatonin/memantin kombinasyonun yalnızca motor fonksiyon bozukluklarını çok güçlü bir şekilde etkilemekle kalmamakta, aynı zamanda hayvanın hiperaktivite ve anksiyetesini de dengelemektedir. Sprague-Dawley sıçanlarda anksiyete artışının gerçekten de depresyon benzeri koşulları işaret ettiği gösterilmesi gerekiyorsa da, melatoninin ve memantin kombinasyonunun psikomotor aktiviteyi dengeleyici etkisi ileride klinik kullanım açısından ümit vermektedir. Klinik farmakolojik çalışmalardaki başarısızlıkların sık karşılaşılan sebeplerinden biri de ilaçların psikomotor yan etkileridir. Gelecekte yapılacak olan çalışmalarda, nöron koruyucu ilaçların etkileri karakterize edilirken, lokomotor testlerin daha dikkatli seçilmesi gerekmektedir.

NMDAR yoğun olarak post-sinaptik membranların sinaptik ve ekstra sinaptik pozisyonlarında bulunurlar. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu merkezi sinir sisteminin gelişimi, sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza oluşumunda hayati bir rol oynamaktadır.

Ancak, NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu, sitoplazma ve mitokondride aşırı miktarda Ca^{+2} birikmesine neden olmaktadır. Yüksek oranda Ca^{+2} birikimi, fosfolipaz A_2 ve siklooksijenaz gibi enzimlerin aktivasyonu ile birlikte serbest radikal oluşumuna ve bunu takiben kalıtsal serbest radikal temizleme mekanizmalarının yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Ca^{+2} birikiminin yanı sıra, aktive edilen enzimler ve serbest radikaller, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS)'ı stimüle ederek, NO ve aşırı toksik bir bileşen olan peroksinitrit ($ONOO^-$) üretimine sebep olmaktadır. Sonrasında, ERK-1/2 ve 38/MAPK, SAPK/JNK1/2 stres kinazların fosforilasyonları, inflamasyon ve apoptozu düzenleyen pro-apoptotik transkripsiyon faktörlerini ve erken dönem genlerini aktive etmektedirler.

Melatonin, yüksek ölçüde toksik hidroksil- ve peroksinitrit- radikalleri de dahil olmak üzere, oksijen ve azot içeren serbest radikallerin detoksifikasyonunda kullanılabilen, klinik anlamda güvenilir niteliğiyle tercih sebebi olan, güçlü bir serbest radikal temizleyicidir. Antioksidan etkilerine ek olarak, elektrofizyolojik çalışmalar göstermektedir ki, melatonin NMDA reseptörlerince düzenlenen beyin aktivitesini baskılamaktadır (109). Melatonin bunu nNOS aktivitesini, dolayısıyla da NO üretimini azaltarak, ve NMDA reseptörünün redoks bölgesiyle etkileşime girerek yaptığını böylece NMDA kaynaklı eksitasyonu baskıladığı öne sürülmektedir (110). Diğer taraftan, melatonin glutamat aracılı uzun süreli potansiyel artışını, bazal sinaptik iletimi etkilemeden, CaM kinaz 2'nin inhibisyonu üzerinden engellemektedir.

Bu bağlamda, sıçanlar ve fareler üzerinde yapılan çalışmalar, melatoninin beyin hasarını azalttığına işaret etmektedir. Melatonin serbest radikal indirgeme ve oksidatif hasarları önlemedeki rolü sadece sinir sistemi ile sınırlı olmayıp organizmadaki her organ ve hücre için geçerlidir bunun bir örneği melatoninin insan kanser hücrelerinde radyoterapi sonrası görülen toksisiteyi azaltmasıdır (111, 112). Toksik olan serbest radikalleri nötralize ederek DNA hasarını minimuma indirir, tümör büyüme faktörünü inhibe ederek IL2 nin antitümör etkilerini artırmaktadır (113). Ayrıca, melatonin kaspaz enzim aktivitesini inhibe ederek kafa travmasında koruyucu rol oynamaktadır.

Kafa travması sonrası sıçanlara, gece melatoninin verip hemisferdeki kontüzyon volümünü ve beyin şişme derecesi ölçüldüğünde travma grubuna göre kontüzyon miktarının daha az olduğu gösterilmiştir (113). Diğer bir deneysel çalışmada ise sıçanlarda oluşturulan travmatik soğuk hasar sonrası, beyin su miktarı, kan beyin

bariyeri geçirgenliği, infarkt alanı araştırılmış ve melatonin verilen grupta travma grubuna göre soğuk hasar bölgesinde ödemin azaldığı, ayrıca infarkt alanının küçüldüğü bulunmuştur (114). Melatoninin infarkt hacmini ve iskemi olan hasarlı beyin bölgesinde apoptotik hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir ve melatoninin nitrik oksit sentaz enzimini düzenleyerek nöronları koruyucu etkisi olduğu savunulmuştur (10). Yapılan bir klinik çalışmada, ağır kafa travması geçiren hastaların beyin omirilik sıvılarında ve kan serumlarında melatonin düzeylerine bakmış ve BOS’da melatonin düzeyi yüksek bulunurken serumda artış olmadığını bulmuştur (115). Saptanılan bu yüksek melatonin düzeyini ise metabolik bozukluklara ve oksidatif strese karşı oluşan yararlı bir reaksiyon olarak yorumlamıştır.

Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen nöronal apoptoz, travmatik patogeneizde önemli rol oynamaktadır (59). Striatum bölgesinde ki nöronal hasar, travmatik beyin hasarından sonra direk mekanik hasar, eksitotoksitite ve oksidatif hasara bağlıdır. Travma kaynaklı ROS üretimi, membran lipid peroksidasyonunu yanı sıra, protein ve DNA’nın oksidatif hasarı gibi çeşitli mekanizmalar aracılığıyla hücrel hasara neden olur (59).

Önceki çalışmalarda melatoninin DNA hasarını ve mitokondriyal sitokrom c salınımını azalttığı, kaspaz-3 aktivitesini önlediğı gösterilmiştir. Ayrıca melatonin, Bcl-2 protein seviyesini artırır. Böylece mitokondreiden sitokrom c salınımı azalır ve kaspaz-9 aktivasyonunu ve apoptozom oluşumunu azaltır.

Sonuç olarak, melatonin ve memantinin hem davranış hem de histomorfolojik açıdan değerlendirilmesi sonucunda elde edilen bulgular bu moleküllerin kafa travması sonrası meydana gelen hasar üzerine etkili olduğunu göstermesine rağmen bu etki özellikle her iki molekülün beraber kullanıldığı grupta ön plana çıkmıştır. Buda travma gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde patofizyolojik süreçleri ayrı ayrı noktalardan etkileyen mekanizmalar üzerinden tedavi seçeneklerinin tek tek kullanımlarından daha iyi sonuç verdiğini göstermektedir. Bu sonuçlar aynı zamanda bu moleküllerin travma gibi ağır hasar meydana getiren hastalıkların insanlarda tedavi amacıyla kullanılabileceğini göstermektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Teasdale G, Jennet B (1974). Assessment of coma and impaired consciousness: A practical scale. *Lancet* 2: 81-84.
2. Ingebrigtsen T, Mortensen K, Rommer B (1998). The epidemiology of hospital-referred head injury in northern Norway. *Neuroepidemiology* 17 :139-146.
3. Ward JD, Weaver P. Closed head injury. Apuzzo MLJ (ed). *Brain Surgery*. C. Livingstone Comp, New York 1993, pp 1351-1372.
4. Graham DI. Neuropathology of head injury. In: Narayan RK, Wilberger JE (eds), *Neurotrauma*. McGraw-Hill Company, New York 1996, pp 43-59.
5. Chesnut RM (1988). Definitive care phase of head injuries. *Surgery Scientific Principles and Practise* 2991-2998.
6. Olney J, Sharpe LG (1969). Brain lesions in infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 166: 386-388.
7. Dugan LL, Choi DW (1994). Excitotoxicity, free radicals and cell membrane changes. *Ann Neurol* 35: 17-21.
8. Hossmann KA (1994). Glutamate mediated injury in focal cerebral ischemia: The excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathology* 4: 23-26.
9. Pulsinelli W (1992). Pathophysiology of acute ischemic stroke. *The Lancet* 339: 533-537.
10. Schulz JB, Matthews RT, Jenkins BG, Ferrante RJ, Siwek D, Henshaw DS, Cipolloni BP, Mecocci P, Kowall NW, Rosen BR, Beal MF (1995). Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo. *J Neurosci* 15: 8419-8429.
11. Miller RJ (1987). Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 235: 46-52.
12. Morley P, Hogan MJ, Hakim AM (1994). Calcium-Mediated mechanisms of ischemic injury and protection. *Brain Pathology* 4: 37-47.
13. Choi DW (1990). Possible mechanisms limited N-methyl-D-aspartate receptor overactivation and the therapeutic efficacy of N-methyl-D-aspartate antagonists. *Stroke* 21:20-22.

14. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984). Voltage dependent block by Mg of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature* 309: 261-263.
15. Nowak L, Bregestowski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984). Magnesium gates glutamate activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 462-465.
16. Siesjö BK, Bengtsson F (1989). Ca^{++} fluxes, calcium antagonists, and calcium related pathology in brain ischemia hypoglycemia, and spreading depression: A Unifying Hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 127-140.
17. Choi D (1990). Methods for antagonizing glutamate neurotoxicity. *Cerebrovasc Brain Metab Rew* 2: 105-147.
18. Dutka AJ, Kochanec PM, Hallenbeck JM (1989). Influence of granulocytopenia in canine cerebral ischemia induced by air embolism. *Stroke* 20: 390-395.
19. Siesjö BOK (1992). Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 77: 169-184.
20. Roda JM, Carceller P, Diez-Tejedor E, Avendano C (1995). Reduction of infarct size by intracarotid nimodipine administered at reperfusion in: A rat model of partially reversible brain focal ischemia. *Stroke* 26: 1888-1892.
21. Harley DM, Kurth M, Bjerkness L, Weiss JH, Choi DW (1993). Glutamate receptor-induced $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J Neurosci* 13: 1993-2000.
22. Clemens JA, Saunders RD, Ho PP, Phebus LA, Panetta JA (1993). The antioxidant LY231617 reduces global ischemic neuronal injury in rats. *Stroke* 24: 716-723.
23. Siesjö BOK (1992). Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 77: 337-354.
24. Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC (1991). Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J App Physiol* 71: 1185-1195.
25. Tymianski M, Charlton MP, Carlen PL, Tator CH (1993). Secondary Ca^{++} overload indicates early neuronal injury which precedes staining with viability indicators. *Brain Res* 607: 319-323.
26. Dawson VL, Izushi VM, Huang PL, Snyder SH, Dawson TM (1996). Resistance to neurotoxicity in cortical cell cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci* 16: 2479-2487.

27. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical culture. PNAS 88: 6368-6371.
28. Koh J, Golberg MP, Hartley DM, Choi DW (1990). Non-NMDA Receptor-mediated neurotoxicity in cortical culture. J Neurosci 10: 693-705.
29. Weiss JH, Turetsky D, Wilke G, Choi DW (1994). AMPA/ Kainate Receptor-Mediated damage to NADPH-Diaphorase-Containing neurons is Ca^{++} dependent. Neurosci Lett 167: 93-96.
30. Dalkara T, Ayata C, Demirci M, Erdemli G, Onur R (1996). Effects of cerebral ischemia on nmda and dihydropyridine-sensitive calcium current. Stroke 27:127-133.
31. Krjevic K (1990). Anoxia and NMDA receptors, In: (EDS Ben Ari Y), Excitatory amino acids and neuronal plasticity. New York: Plenum Press, 475-479.
32. Graf R, Heiss WD, Wiendhard, K. et al. (1994). Excitotoxicity: interaction of neuroactive substances during prolonged focal ischemia in cats. In: Kriegstein, J. Oberpichler- Scwenk, H (Eds). Pharmacology of Cerebral Ischemia. Stuttgart: Medpharm, 239-251.
33. Hossmann K.A (1994). In: (EDS Kriegstein J, Oberpichler- Scwenk H), Mechanisms of ischemic injury: is glutamate involved pharmacology of cerebral ischemia. Stuttgart: Medpharm, 239-251.
34. Cheung JY, Bonventre JV, Malis CD, Leaf A (1986). Calcium and ischemic injury. the New England Journal of Medicine 314: 1670- 1676.
35. Cross CE, Halliwell B, Borish ET (1987). Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med 1107: 526-45.
36. McCord JM (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J med 312: 159-63.
37. Halliwell B (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence. Lancet 344: 721-724
38. Wilson JX, Gelb AW (2002). Free radicals, antioxidants, and neurologic injury: possible relationship to cerebral protection by anesthetics. J Neurosurg Anesthesiol 14: 66-79.

39. Warner DS, Sheng H, Batinic-Haberle I (2004). Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 207: 3221-3231.
40. Stelmasiak Z, Tarach JS (2000). Nowicka-Tarach BM, Mitosek-SzeWczyk K. Drop A. Idiopathic hypoparathyroidism with intracranial calcifications and dominant skin manifestations. *Med Sci Monit* 6: 145-150.
41. Anggard E (1994). Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 343: 1199-1206.
42. Moncada S, Higgs A (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012
43. Fonum F (1984). Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42: 1-11
44. Gutteridge JM (1994). Biological origin of free radicals, and mechanism of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 91: 133-140.
45. Demopoulos HB, Flamm E, Seligman M, Pietronigro DD (1982). Oxygen free radicals in central nervous system ischemia and trauma. In *Pathology of Oxygen*, NY, Academic Press. 127-55
46. Halliwell B, Gutteridge JM (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280: 1-8
47. Vinson J, Hsu C, Possanza C, Draek A, Pane D, Davis RA (1994). Lipid peroxidation and diabetic complications effect of antioxidant vitamin c and e. *Advances Experimental Medicine and Biology* 366: 430-432.
48. Wakatsuki A, Okatani Y, Shinohara K, Ikenoue N, Fukaya T (2001). Melatonin protects against ischemia/reperfusion-induced oxidative damage to mitochondria in fatal rat brain. *J Pineal Res* 31: 167-172.
49. GY, Schielke GP, Gong C, Mao Y, Ge HL, Liu XH, Betz AL (1999). Expression of tumor necrosis factor-alpha and intercellular adhesion molecule-1 after focal cerebral ischemia in interleukin-1beta converting enzyme deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 1109-1117.
50. Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC (1997). Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 825: 179-193.

51. Kim JS (1996). Cytokines and adhesion molecules in stroke and related diseases. *J Neurol Sci* 137: 69-78.
52. Yamasak Y, Matsuo Y, Matsuura N, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K (1995). Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rats. *Stroke* 26: 318-23.
53. Kato H, Kogure K, Liu XH, Araki T, Itoyama Y (1996). Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 23: 203-212.
54. Chopp M, Li Y, Jiang N, Zhang RL, Probst J (1996). Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 578-584.
55. T, Lucero J, Heo JH, Tagaya M, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ (1999). Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin alpha (v) beta 3 during focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 1038-1050.
56. Kim JS, Gautam SC, Chopp M, Zaloga C, Jones ML, Ward PA, Welch KM (1995). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neuroimmunol* 56: 127-134.
57. Takami S, Nishikawa H, Minami M, Nishiyori A, Sato M, Akaike A, Satoh M (1997). Induction of macrophage inflammatory protein MIP-1alpha mRNA on glial cells after focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci Lett* 227: 173-176.
58. Wyllie A, Kerr J, Currie A (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306.
59. Schulz JB, Weller M, Moskowitz MA (1999). Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative disease. *Ann Neurol* 45: 421-429.
60. Parsons CG, Danysz W, Quack G (1999). Memantin is a clinically well tolerated n-methyl-d-aspartate (nmda) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology* 38: 735-767.
61. Lipton SA (2004). Failures and successes of nmda receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantin in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx: J Neuro Therapeutics* 1: 101-110.

62. Robinson DM, Keating GM (2006). Memantin: a review of its use in alzheimer's disease. *Drugs* 66: 1515-1534.
63. Small DL, Morley P, Buchan AM (1999). Biology of ischemic cerebral cell death. *Progress in Cardiovascular Diseases* 42: 185-207.
64. Lipton SA (2006). Paradigm shift in neuroprotection by nmda receptor blockade: memantin and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 5: 160-170.
65. Claustrat B, Brun J, Chazot G (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews* 9: 11-24.
66. Cardinali DP, Pévet P (1998). Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev* 2: 175-190.
67. Reiter RJ (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49: 654-664.
68. Hardeland R, Poeggeler B (2003). Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res* 34: 233-241.
69. Reiter RJ, Tan,D (2002). Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957: 341-344.
70. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R (2006). Melatonin: nature's most versatile biological signal. *The FEBS Journal* 273: 2813-2838.
71. Moore RY (1997). Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annu Rev Med* 48: 253-266.
72. Axelrod J (1974). The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 184: 1341-1348.
73. Bubenik GA (2002). Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci* 47: 2336-2348.
74. Slominski A, Pisarchik A, Semak I, Sweatman, T, Wortsman J, Szczesniewski A, Slugocki G, McNulty J, Kauser S, Tobin DJ, Jing C, Johansson O (2002). Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J* 16: 896-898.
75. Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C (2003). Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res* 34: 81-87.

76. Liu C, Fukuhara C, Wessel JH, Iuvone PM, Tosini G (2004). Localization of aa-nat mrna in the rat retina by fluorescence in situ hybridization and laser capture microdissection. *Cell and Tissue Res* 315: 197-201.
77. Champier J, Claustrat B, Besancon R, Eymin C, Killer C, Jouvet A, Chamba G, Fevre-Montange M (1997). Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-o-methyl-transferase mrnas in human blood platelets. *Life Sci* 60: 2191-2197.
78. Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P, Malpaux B (2002). Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology* 143: 84-90.
79. Tricoire H, Møller M, Chemineau P, Malpaux B (2003). Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Repro Supp* 61: 311-321.
80. Reiter RJ, Tan D, Osuna C, Gitto E (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *Bio Sci* 7: 444-458.
81. Hardeland R, Pandi-Perumal S (2005). Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nut and Met* 2: 22-27.
82. Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA (2005). Putting cancer to sleep at night: the neuro-endocrine/circadian melatonin signal. *Endocrine* 27: 179-188.
83. Srinivasan V, Spence DW, Trakht I, Pandi Perumal SR, Cardinali DP, Maestroni GJM (2008). Immunomodulation by melatonin: its significance for seasonally occurring diseases. *Neuroimmunomodulation* 15: 93-101.
84. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36: 1-9.
85. Tan D, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res* 42: 28-42.
86. Barlow- Walden L, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Mendez-Pelaez A (1995). Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 26: 497-502.

87. Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML, Rodriguez-Colunga MJ, Tolvia D, Mendez-Pelaez A (1996). Neurohormone melatonin prevents cell damage: Effect of gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 10: 882-890.
88. Pierrefiche G, Laborit H (1995). Oxygen free radicals, melatonin and aging. *Exp Gerontol* 30: 213-227.
89. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munos-Hoyos A (1997). Pharmacological action of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 60: 2255-2271.
90. Reiter RJ (1998). Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Prog in Neurobiol* 56: 359-384.
91. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ (1993). Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1: 57-60.
92. Reiter RJ, Melchiorri D, Seweynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo DA (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 18: 1-11.
93. Bubenik GA, Brown GM (1997). Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of rats. *Biol Signals* 6: 40-44.
94. Bettahi I, Pozo D, Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Guerrero JM (1996). Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res* 20: 205-210.
95. Guerrero JM, Reiter RJ, Ortiz GG, Pablos MI, Sewerynek E, Chuang JI (1997). Melatonin prevents increases in neuronal nitric oxide and cyclic gmp production after transient brain ischemia and reperfusion in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Pineal Res* 23: 4-31.
96. Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Mendenez-Pelaez A, Chen LD, Saarela S (1994). Melatonin as a free radical scavenger: Implications for aging and age-related diseases. *An New York Ac Sci* 1-11.
97. Dubocovich ML, Markowska M (2005). Functional mt1 and mt2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27: 101-110.
98. Ekmekcioglu C (2006). Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60: 97-108.

99. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJM, Zisapel N, Cardinali DP (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog in Neurobio* 85: 335-353.
100. Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM (1994). Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from xenopus dermal melanophores. *PNAS* 91: 6133-6137.
101. Lighthall JW, Anderson TE (1994). The neurobiology of cenral nervous system trauma. New York/Oxford: Oxford University Press, 3–12.
102. Clark RS, Schiding JK, Kaczorowski SL, Marion DW, Kochanek PM (1994). Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *J Neurotrauma* 11: 499 –506.
103. Rall JM, Matzilevich DA, Dash PK (2003). Comparative analysis of mRNA levels in the frontal cortex and the hippocampus in the basal state and in response to experimental brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29: 118 –131.
104. Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T (2002). Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat. *Nat Rev Neurosci* 3: 574– 579.
105. Denny-Brown D, Russell WR (1941). Experimental cerebral consussion. *Brain* 64: 93–164.
106. Povlishock JT, Hayes RL, Michel ME, McIntosh TK (1994). Workshop on animal models of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 11: 723–732.
107. Cernak I (2005). Animal Models on Head Trauma. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2: 410–422.
108. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG (1981). Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res* 211: 67–77.
109. Reiter RJ, Tan D, Leon J, Kilic U, Kilic, E (2005). When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. *Exp Bio and Med* 230: 104-117.
110. Martin M, Macias M, Escames G. (2000) Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J*; 14:1677–1679.

111. Dundar K, Topal T, Ay H, Oter S, Korkmaz A (2005). Protective effects of exogenously administered or endogenously produced melatonin on hyperbaric oxygen-induced oxidative stress in the rat brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 926-930.
112. Karbownik M, Tan DX, Reiter RJ (2000). Melatonin reduces the oxidation of nuclear DNA and membrane lipids induced by the carcinogen delta-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 88: 7-11.
113. Paparrigopoulos T, Melissaki A, Tsekou H, Efthymiou A, Kribeni G, Baziotis N, Geronikola X (2006). Melatonin secretion after head injury: a pilot study. *Brain Inj* 20: 873-878.
114. Görgülü A, Palaoğlu S, Ismailoğlu O, Tucel M, Sürücü MT, Erbil M, Kılınç K (2001). Effect of melatonin on cerebral edema in rats. *Neurosurgery* 49: 1434-1441.
115. Seifman MA, Adamides AA, Nguyen PN, Vallance SA, Cooper DJ, Kossman T, Rosenfeld JV, Morganti-Kossmann MC (2008). Endogenous melatonin increases in cerebrospinal fluid of patients after severe traumatic brain injury and correlates with oxidative stress and metabolic disarray. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 684-696.

ETİK KURUL ONAYI

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik No/Pasaport No : 37630254640
Soyadı, Adı : Keleştemur Taha
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum tarihi ve yeri : 21.03.1984 Kayseri
Medeni hali : Evli
Telefon : 05336389380
Faks :
E-posta : tktemur@yahoo.com
Yazışma adresi : T. C. Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji ABD. 34755 Kayışdağı cad.
Ataşehir/İSTANBUL

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisan	İstanbul Üniversitesi	2009
Lise	Aydınlıkevler Lisesi	2002

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

GÖREVİ	KURUM	SÜRE (YIL)
1. Fizyoloji Asistanı	Yeditepe Üniversitesi	2 YIL

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Fizyoloji

HOBİLER

Kayak

