

Yaşlanmada Apoptozis ve Melatoninin Etkisi

THE EFFECTS OF APOPTOSIS AND MELATONIN LEVELS ON AGING

Dr.Hakan PARLAKPINAR,^a Dr.Mustafa KOÇ,^a Dr.Ahmet ACET^a

^aFarmakoloji AD, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, MALATYA

Özet

Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozis; normal insan gelişiminin, immün sistemin ve vücut homeostazının vazgeçilmez bir bileşenidir. Apoptozisin moleküler ve biyokimyasal mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Yaşlanma, fizyolojik fonksiyonlarda ve metabolik işlevlerde ilerleyici kötüleşme ile karakterizedir. Yaşlanma olayını açıklamaya çalışan çok sayıda hipotez olmasına rağmen, mekanizması halen tam olarak tanımlanamamıştır. Bazı sağlam hücre tiplerinde fizyolojik şartlarda yaşlanma ile apoptozis artar. Bununla beraber genetik hasarlı preneoplastik hücrelerde apoptozis yaşlanma ile baskılanır. Sonuç olarak apoptozis yaşlanma ve kanser oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Pineal bezden salınan ana hormon olan melatonin, direkt serbest radikal süpürücü ve indirekt antioksidan etkiye sahiptir. Bilinen en güçlü antioksidan hormon olan melatonin, pek çok deneysel modellerde hücre hasarı önlemiştir. Bu özellikleri yaşlanmayla artan hasarlanmış, disfonksiyonel hücrelere karşı koruyucu olarak melatoninin kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, melatonin, yaşlanma

T Klin Tıp Bilimleri 2004, 24:62-67

Abstract

Apoptosis, also known as a programmed cell death, is an indispensable component of normal human growth, immunoregulation and homeostasis. Knowledge of the molecular mechanism of apoptosis is providing insights into the causes of multiple pathologies where aberrant cell death regulation is manifest. Aging is characterized by a progressive deterioration in physiological functions and metabolic processes, ultimately leading to morbidity and mortality. Although many hypotheses have been proposed to explain the aging process, the exact mechanisms are not well-defined. Recently accumulating evidence indicates that dysregulation of the apoptotic process may be involved in some aging processes. It has been concluded that apoptosis plays an important role in the aging process and tumorigenesis. In addition, melatonin, chief secretory product of the pineal gland, is a direct free radical scavenger and indirect antioxidant. As such, it would appear to be advantageous to test melatonin in clinical trials for the prevention of possible damaged and dysfunctional cells associated with aging.

Key Words: Apoptosis, melatonin, aging

T Klin J Med Sci 2004, 24:62-67

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozis kavramı ilk olarak Kerr Wyllie tarafından 1972'de tanımlanmıştır.¹ *Yunanca* apo=ayrı ptosis=düşmek anlamına gelen, ağaç veya çiçek yapraklarının düşmesini tanımlayan bir kelimedir. Fizyolojik hücre ölümü, veya büzüşme nekrozu gibi isimlerle de tanımlanmaya çalışılmıştır.¹ Apoptozis, üzerinde çalışmaların en yoğun olduğu konulardan biri olmasına rağmen hala tartışmalara açık olup, moleküler ve biyokimyasal işleyişi tamamen açıkça

kavuşturulamamıştır. Bunun neticesinde pek çok araştırmacı farklı görüşler ortaya koymuştur. Apoptozis, yaşamak için birbirine ihtiyacı olan hücrelerin düzenlediği bir cevap olarak tanımlanmıştır.² Bu görüş, dört önemli kavram tanımlanmasına yol açmıştır; 1) Bir hücre, diğer hücrelerden kaynaklanan hücre yaşam sinyalleri ile canlı tutulmadıkça apoptozisle ölebilir. Apoptozis'in kitlesel kontrolü, hücre sayısına bağlı doku homeostazını sağlamada önemli rol oynar. 2) Hücre yaşamı için komşu hücrelere bağımlılık, hücre metastazını önlemek için güçlü bir uyarıdır. 3) Büyüme faktörlerinin terapotik uygulanması, hastalık işlevlerinde apoptozisi bloke edebilir. 4) Hücre büyümesi için apoptozis programlarının inhibisyonu gerekli olabilir. Pineal bezin majör hormonu olan melatonin, birçok biyolojik etkisinin yanı sıra, potent bir radikal süpürücü ve antioksidan özelliğe sahiptir. Bilinen tüm antioksidanlardan

Geliş Tarihi/Received: 08.11.2002 Kabul Tarihi/Accepted: 18.11.2003

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr.Hakan PARLAKPINAR
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Bölümü,
44069, MALATYA
hparlakpinar@hotmail.com

Copyright © 2004 by Türkiye Klinikleri

daha potent serbest radikal süpürücü özelliği vardır.³ Yaşlanma ile birlikte pineal bezin fonksiyonları ve melatonin düzeyi azalırken, beraberinde antioksidan kapasitenin azalmasına bağlı olarak yaşlanma ile ilgili hastalıklarda artış olmaktadır.⁴ Yapılacak ileri çalışmalar melatonin'in bu özelliklerinin yaşlanmada artış gösteren apoptozis üzerine etkili olup olmayacağını ortaya koyacaktır.

Yaşlanma ve Apoptozis

Yaşlanma olayını açıklamaya çalışan çok sayıda hipotez olmasına rağmen, mekanizması halen tam olarak tanımlanamamıştır. Ancak yapılan araştırmalar neticesinde apoptotik düzenlenmedeki bozuklukların, bu olayda rol oynayabileceği anlaşılmıştır. Bununla birlikte yaşlanma sürecinde apoptozisin nasıl başladığı da açık değildir. Yaşlanma, bazı hücre tiplerinde apoptozisi ve apoptozise hassasiyeti artırmaktadır. Buna karşılık genetik olarak hasarlanmış ve preneoplastik hücrelerde ise, yaşlanma ile apoptozis baskılanır.⁵ Yaşlanma ile ilgili teorilerin iki ortak noktası vardır; 1) Yaşlanma; gelişim ve morfogenez gibi genetik programın sonucudur. 2) Yaşlanma; homeostatik eksikliklere vücudun adapte olamamasıdır. Farklı alanlardaki araştırmacılar, yaşlanma ile birlikte birçok biyolojik belirteçlerde değişiklikler tespit etmişlerdir. Ancak bunlar yaşlanmanın sebebi değil, sonucudur.⁶ *In vivo* olarak yaşlanmanın apoptozisi artırması veya azaltması konusu halen şüphelidir. Yaşla ilgili apoptozisin düzenlenmesindeki bozuklukların genetik olarak mı programlandığı, yoksa homeostatik eksikliklere karşı adapte olamamanın bir sonucu mu olduğu da halen anlaşılamamıştır. Oksidatif stres ve DNA hasarı; apoptozisi indükleyen önemli iki faktördür.⁷ Fare ve insanlarda yapılan bazı çalışmalarda, yaşlanma ile birlikte T-hücrelerinde⁸ ve hepatositlerde⁹ apoptozise gidişin arttığı gözlenmiştir. Ancak farklı tür ve yaştaki hayvanlarla yapılan çalışmalarda ise; T-hücrelerinde apoptozise karşı direnç olduğu, bunun sonucunda lenfoproliferatif ve otoimmün hastalıklar geliştiği görülmüştür.¹⁰ Elde edilen bu farklı neticenin, çalışılan hayvan ve hücre tiplerindeki farklılığa bağlı olabileceği kaydedilmiştir.⁵

Yaşlılıkta Apoptozis Artışının Mekanizmaları

Apoptozisin başlamasında en iyi karakterize edilen yollardan birisi de hücre dışı ölüm sinyal proteinlerinin (Fas ligand) kendi hücre yüzey reseptörlerine bağlanmasıdır.¹¹ Bu bağlanma sonucu oluşan apoptozis sinyali, yüzeyinde Fas molekülü taşıyan hücrenin çekirdeğine iletilir. Fas reseptörleri ile olan bu uyarı sonucunda, hücrede apoptozisle ölüm gerçekleşir. Alzheimer hastalığında da kortikal nöronlarda, hepatositlerde ve renal tübül epitel hücrelerinde yaşla birlikte artmış Fas reseptör ekspresyonu tespit edilmiştir.⁹ Sürekli bölünen hücrelerde yaşın etkisi, hücre tiplerine ve yapılarına göre değişir. Mesela, yaşlanma ile intestinal epitel hücrelerinde apoptozis artmaz.¹² Lenfositlerle ilgili olarak apoptozis ve Fas reseptör ekspresyonu hakkında farklı sonuçlar yayımlanmıştır. Bu farklılıkların sebebi deney hayvanlarının çeşitliliğine, kullanılan farklı metotlara ve çalışılan dokulara (lenfosit, dalak, lenf nodu) bağlı olabilir. Yaşla Fas reseptör upregülasyonuna bağlı apoptozisin arttığı ve bunun da yaşlı insanları, lenfoproliferatif ve otoimmün hastalıklara karşı koruyucu bir mekanizma olduğu ileri sürülmüştür. Bu sonuçlarla, Fas ligand/reseptör sinyalinin yaşla birlikte artan apoptozis yolağını uyaran en önemli etken olduğu düşünülebilir.¹³ Fas ligand/reseptörü farklı durumlara cevap olarak uyarılabilir. Örnek: insan hepatosit hücrelerinde aşırı bakır birikimi; oksidatif stres oluşturur ve Fas ligand/reseptör ekspresyonu ile hepatositlerde apoptozis artar.¹⁴ Yapılan çalışmalar p53 aracılı transkripsiyon aktivasyonunun, oksidatif stres ve DNA hasarına karşı kritik bir cevap niteliğinde olduğunu göstermiştir.¹⁵ Yaşlanma, hücre ve DNA hasarını hızlandırır. Buna karşılık p53 aktivasyonu ve Fas ligand/reseptör upregülasyonu ile hücrede apoptozise gidiş artırılarak, tümör oluşumu engellenmeye çalışılır. Hepatokarsinomlu olguların erken basamaklarında, p53 geninde mutasyon olduğu görülmüştür.¹⁶

Yaşlanma; fizyolojik fonksiyonlarda ve metabolik işlevlerde ilerleyici kötüleşme ile karakterizedir. 16-24 aylık hayvanlar ile 6 aylık hayvanlar karşılaştırıldığında; sitozolik sit c' nin 16-24 aylıklarda belirgin olarak yükseldiği görülmüştür. Bununla birlikte anti-apoptotik bir protein olan bcl 2

(B cell lymphoma/leukemia-2) nin yaşla birlikte azaldığı tespit edilmiştir. Ancak proapoptotik bir protein olan bax miktarı değişmemiştir. APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) ve caspase-3 (Cysteine-containing Aspartate Specific Proteases) aktivitesi üç grupta da aynı kalmıştır. Yaşla birlikte kronik oksidatif stresin belirtisi; yaşlı hayvanların kalp mitokondrilerinde superoksit radikallerinde ve hidrojenperoksit düzeyindeki artışa bağlı olarak manganaz superoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz aktivitesinin ve lipid peroksidasyonunun artışıdır.¹⁷ İnsan ve hayvanlarda yaşlanmayla birlikte total miyosit sayısında azalma ve diğer hücrelerde de hipertrofi görülür.¹⁸ Önemli bir nokta; bu hücre kaybının, altta yatan herhangi bir patoloji (örneğin ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik kalp hastalığı gibi) olmasa da görülmesidir. Yetmiş yaşında bir erkek, yaşlanma ile birlikte miyositlerinin % 30'unu kaybeder.¹⁹ Hücre kaybı nekroz yoluyla olmakla beraber, apoptozis de önemli bir faktördür. Apoptozis ve nekroz arasında biyolojik ve morfolojik yönlerden belirgin farklılıklar vardır. Nekroz, kimyasal ve fiziksel yaralanmaları takiben ortaya çıkan patojik bir ölüm şeklidir. Başta mitokondriyon olmak üzere sitoplazmik organeller hasarlanır, hücre membranı seçici geçirgenliğini kaybeder ve şişerek parçalanır. Hücre içeriği çevre dokuya yayılarak yangısal bir cevap oluşturmaz. Apoptotik hücrede, nekrozun aksine en çarpıcı değişiklik çekirdekte meydana gelir. Hücre küçülür, yüzeyinde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Sitoplazmada yoğunlaşma, hücre dansitesinde artma, ve çekirdek membranına yakın bölgelerden başlayarak kromatinde yoğunlaşma görülür. En sonunda da DNA kırılmaları başlar.²⁰ Yapılan bir çalışmada; 24 aylık ratların sol ventriküllerinde tespit edilen apoptotik hücre miktarı, 16 aylık ratlarla karşılaştırıldığında %200 artmıştır. Nekrotik hücre ölümünde ise değişiklik olmamıştır.²¹ Bu sonuç yaşlı ratlarda apoptozisin prevalansının, nekrozdan daha fazla olduğunu göstermiştir.

Yaşlılıkta Mitokondriyal Değişiklikler ve Apoptozis

Mitokondri, apoptozisin düzenlenmesinde kilit rol oynamaktadır. Hücre ölümü artırıcı pek çok

sinyallerden biri olan reaktif oksidanlar, intraselüler kalsiyumu artırır. Fizyolojik koşullarda hücre içi biriken fazla kalsiyum dışarı atılarak yada hücre içinde depolanarak tolere edilir. Serbest radikal üretimi ise kalsiyum depolanmasını engelleyerek bir kısır döngüye neden olur.²² Bunun ile ilgili mekanizmalar olarak; tirozin kinaz reseptörü, protein kinaz C ve MAP kinaz (mitogen-activated protein kinase)' ların aktivasyonu sorumlu tutulmaktadır.²³ Artmış kalsiyum, sit c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi kaspaz aktive edici faktörlerin mitokondriden salınımını tetikler. Mitokondriden sitozole sit c salınımı, caspase-9'u aktive eder. Caspase-9, hücre ölümünü tetiklemek için caspase-3'ü aktive eder. Bundan dolayı yaşla birlikte oksidanlara bağlı gelişen mitokondriyal bozulmalar, kardiyomiyositlerdeki apoptozisten direkt olarak sorumlu olabilir. Ayrıca antiapoptotik bir protein olan bcl-2 deki yaşla birlikte olan azalma, sitokrom c' deki değişimleri açıklayabilir. Bcl-1 ve bak gibi diğer bcl-2 ailesel proteinleri de yaşla birlikte mitokondriden sit c salınımını etkileyebilirler.¹⁷ Neticede yapılan çalışmalardan şu sonuçlar doğmuştur;

1-Bazı sağlam hücre tiplerinde fizyolojik şartlarda yaşlanma ile apoptozis artar. **2-**Genetik hasarlı preneoplastik hücrelerde apoptozis, yaşlanma ile baskılanır. **3-**Bölünmeyen hücrelerde uzun süreli oksidatif strese maruz kalma sonucu apoptozis artar ve oluşan hücre kaybı, vücut fonksiyonlarında azalmaya yol açar. **4-**Bölünen hücrelerde ise disfonksiyonel hücreler apoptozis ile elimine edilerek homeostazis sağlanmaya çalışılır. **5-**Yaşla indüklenen apoptozis muhtemelen Fas reseptör/ligand upregülasyonu ile ilişkilidir. **6-**Apoptozis, yaşlanmada ve kanser oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Böylece yaşlanmayla birlikte artış gösteren apoptozis, kanser oluşumuna karşı doğal bir koruyucu mekanizma olabilir.⁵

Melatonin ve Yaşlanma

Melatonin, pineal bezin majör hormonudur. Melatonin salgılanma hızını belirleyen en önemli faktör, çevrenin aydınlık veya karanlık olmasıdır. Genel olarak, ışık melatonin yapımını azaltır, karanlık ise artırır.²⁴ Melatonin sentezinde başlangıç

maddesi, pineal bez tarafından plazmadan alınan ve bir indol aminoasit olan "triptofan" dır. Triptofan esansiyel bir aminoasit olup, besinlerle dışarıdan alınması gerekir. Triptofan, pinealositlerde triptofan hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptofan'a hidroksillenir. 5-hidroksitriptofan Aromatik-L-aminoasit dekarboksilaz ile 5-hidroksitriptamin (serotonin)' e dekarboksillenir. Serotonin, N-asetil transferaz (NAT) enzimi ile N-asetil serotonin' e ve bu da, hidroksiindol-o-metil transferaz etkisi ile melatonin (N-asetil-5 metoksitriptamin)'e dönüşür. Melatonin, pineal bezde depolanmadan hızlı bir şekilde komşu kapiller damarlara geçer. Lipofilikliğinin çok yüksek olmasından dolayı, tüm biyolojik doku ve sıvılara dağılır. Plazmada yaklaşık %70'i albumine bağlanarak taşınır. Çoğu karaciğerde olmak üzere böbrekte de metabolize edilir.²⁵ Birçok biyolojik etkisinin yanı sıra, potent bir radikal süpürücü (hidroksil radikali, süperoksid anyon radikali, peroksil radikali, singlet oksijen ve peroksinitrit anyonuna güçlü etkili) ve antioksidan (SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz stimülasyonu ve NOS inhibisyonu) özelliğe sahiptir. Bilinen tüm antioksidanlardan (mannitol, glutatyon, vit E, C gibi) daha potent serbest radikal süpürücü özelliği vardır.³ İnsanda serum antioksidan kapasitesinin, melatonin düzeyi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Yaşlanma ile birlikte pineal bezin fonksiyonları ve melatonin düzeyi azalırken, beraberinde antioksidan kapasitenin azalmasına bağlı olarak yaşlanma ile ilgili hastalıklarda artış olmaktadır.⁴ Her ne kadar retinada da melatonin sentezlendiği bildirilmişse de, hızlı bir şekilde retinada tekrar katabolize edildiği için dolaşımdaki melatonin konsantrasyonlarını önemli ölçüde etkilememektedir. Pinealektomi sonrası melatonin'in ritmik pik seviyeleri elimine olmaktadır.²⁶ Pinealektomi yapılmış ratlarda yapılan bir çalışmada, artan oksidatif hasar, dolaşımdaki azalmış melatonine bağlanmıştır.²⁷ Farelerde yapılan bir çalışmada, melatonin tedavisinin yaşam süresinde %25 lik bir artışa neden olmakla beraber, bu farelerin daha genç, sağlıklı ve güçlü görüldüğü, seksüel aktivitelerinin de daha uzun süre devam ettiği bildirilmiştir.²⁸ Aynı bir çalışmada, genç ve yaşlı farelerin pineal bezleri

çapraz transplantasyon yapıldığında 18 aylık farelerin pineallerinin transplante edildiği 4 aylık farelerde yaşlanma hızlanmış olup diğer grupta ise yaşlı farelerin durumlarında iyileşme ve yaşam sürelerinde artma tespit edilmiştir.²⁹ Lenz ve ark, dişi farelere günlük 100 µg melatonin injeksiyonu yaptıklarında, bu farelerin yaşam sürelerinin arttığını, özellikle de 08.00-10.00 saatleri arasında melatonin uygulanan grupta, bu farkın daha belirgin olduğunu gözlemlemiştirler.³⁰ Sonuç olarak diyebiliriz ki, çok güçlü serbest radikal süpürücü ve antioksidan özelliği olması ve yaşlanmayla beraber artan serbest radikal hasarında, vücutta azalmış melatonin seviyelerinin tespit edilmesi; melatoninin yaşlanma olayını açıklamaya çalışan araştırmacıların ilgi odağı haline getirmiştir.

Tartışma

Apoptozis, halen tıp alanında en fazla araştırılan konulardan biridir. Bununla beraber tayin metodu ve tedavi prensipleri henüz tamamen standartize edilememiştir. Özellikle kronik antiapoptotik tedavinin güvenilirliği ve yan etkileri üzerinde hala tartışılmaktadır. Çünkü proapoptotik uyarı alan bir hücrenin sadece canlılığı değil, aynı zamanda fonksiyonları da etkilenmektedir.³¹ Apoptozis oluşumunda kaspaz enzimlerinin önemli bir rol oynaması nedeniyle, Thomas ve arkadaşları; kaspaz inhibitörleri ile ilgili yaptıkları bir çalışmada şu tartışmayı açmışlardır; hasardan sorumlu olan primer kaspazların tanımlanması ve ona yönelik inhibitör kullanma gerekliliği vardır.³² Şokla ilgili bir çalışmada, kaspaz inhibitörlerinin nöroprotektif etki gösterebilmesi için reperfüzyonun hemen başlangıcında verilmesi gerekliliğini gösteren çalışma mevcut olduğu gibi,³³ diğer bir çalışmada ise; reperfüzyondan 9 saat sonra faydalı bulunduğu gösterilmesi, ilaç uygulanma zamanlarının da hala kesin olmadığını ve değişebileceğini göstermiştir.³⁴ Belki de en önemlisi; kaspaz inhibitörleri ile kurtarılan miyositlerin fonksiyonlarının normal olup olmayacağı da bilinmemektedir. Bununla beraber halen bilinen pek çok ilaçlar (örneğin non-steroidal antiinflamatuvarlar), etkin olarak apoptozisin derecesini etkilemektedir. Kullanılan tüm sitotoksik ilaçlar ve radyoterapi programları, tümör hücrele-

rinde apoptozisi artırır. Tedavinin başarısızlığı ile apoptozise direnç arasında güçlü bir ilişki vardır. Bu terapiler aynı zamanda normal hücrelerde de apoptozisi indüklerler. Kemik kırıkları, gut ve oral mukoza ülserleri, kullanılan dozu sınırlar.³⁵ Yapılan çeşitli çalışmalarda, yaşlanmadaki hücre hasarının serbest radikaller ile bağlantısından dolayı, glutatyon, vitamin C, E, ve ginkgo biloba gibi antioksidanlar yaşlanma ile ilişkili oksidatif stresi önlemiş veya en azından geciktirmiştir.^{36,37} Bu yüzden, yaşlanma ile direkt etkisini ortaya koymak için üzerinde pek çok çalışma yapılan pineal bezin majör hormonu olan melatonin de, bilinen en güçlü serbest radikal süpürücü ve antioksidan özelliği olması ve yaşlılıkta serbest radikal hasarındaki artışın azalmış melatonin düzeyleri ile birlikte olması ve melatonin verilmesi ile hücresel hasar göstergelerinin düzelmesi, melatonin'i ilgi odağı haline getirmiştir.²⁷Yapılacak ileri çalışmalar, melatonin'in bu özelliklerinin yaşlanmada artış gösteren apoptozis üzerine etkili olabileceğini ortaya koyacaktır.

KAYNAKLAR

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-57.
- Raff MC. Social control on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356:397-400.
- Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Wenbo QI. Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. *Proc West Pharmacol Soc* 1998; 41:229-36.
- Reiter RJ. The pineal gland and melatonin relation to aging: A summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol* 1995; 30:199-212.
- Higami Y, Shimokawa I. Apoptosis in the aging process. *Cell Tissue Res* 2000; 301:125-32.
- Masoro EJ. Aging: current concepts. In: Masoro EJ, editor. *Aging*. New York: Oxford University Press; 1995. p.3-21.
- Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; 15:7-10.
- Chrest FJ, Buchholz MA, Kim YH, Kwon TK, Nordin AA. Anti-CD3-induced apoptosis in T-cells from young and old mice. *Cytometry* 1995; 20:33-42.
- Higami Y, Shimokawa I, Okimoto T, Tomita M, Yuo T, Ikeda T. Effect of aging and dietary restriction on hepatocyte proliferation and death in male F344 rats. *Cell Tissue Res* 1997; 288:69-77.
- Spaulding CC, Walford RL, Effros RB. The accumulation of non replicative, nonfunctional, senescent T cells with age is avoided in calorically restricted mice by an enhancement of T cell apoptosis. *Mech Ageing Dev* 1997; 93:25-33.
- Osborne BA. Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immun system. *Curr Opin Immunol* 1996; 8:355-61.
- Holt PR, Moss SF, Heydari AR, Richardson A. Diet restriction increase apoptosis in the gut of aging rats. *J Gerontol Abiol* 1998; 53:168-72.
- Aggarwal S, Gupta S. Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans altered expression of Fas (CD95), Fas ligand, Bcl-2, and Bax. *J Immunol* 1998; 160:1627-37.
- Strand S, Hofmann WJ, Krammer PH, Galle PR. Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis. *Nat Med* 1998; 4:588-93.
- Banin S, Moyal L, Shieh S, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998; 281:1674-77.
- Masui T, Nakanishi H, Inada K, et al. Highly metastatic hepatocellular carcinomas induced in male F344 rats treated with N-nitrosomorpholine in combination with other hepatocarcinogens show a high incidence of p53 gene mutations along with altered mRNA expression of tumor-related genes. *Cancer Lett* 1997; 112:33-45.
- Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2002; 282:423-30.
- Anversa P, Hiler B, Ricci R, Guideri G, Olivetti G. Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. *J Am Coll Cardiol* 1986; 8:1441-8.
- Olivetti G, Giordano G, Corradi D, et al. Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:1068-79.
- Ayaşlıoğlu E. Apoptoz. *T Klin J Med Sci* 2001; 21:57-62.
- Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, et al. Necrotic and apoptotic Miocene cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1996; 271:1215-28.
- Cheung YJ, Bonventre JV, Malis CD, Leaf A. Calcium and ischemic injury. *N Engl J Med* 1986; 314:1670-6.
- Das DK. Redox regulation of cardiomyocyte survival and death. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3:23-37.
- Vanecek J. Cellular mechanism of melatonin action. *Physiol Rev* 1998; 78:687-721.
- Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997; 336:186-95.
- Reiter J. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol* 1995; 16:383-415.
- Parlakpınar H, Sahna E, Ozer MK, Ozugurlu F, Vardi N, Acet A. Physiological and pharmacological concentrations of melatonin protect against cisplatin-induced acute renal injury. *J Pineal Res* 2002; 33(3):161-6.
- Klatz R, Goldman R. *Stopping the clock*. 2nd ed. New York: Bantam Books 1997. p.27-47.
- Pierpaoli W, Regelson W. Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(2):787-801.

30. Lenz SP, Izui S, Benediktson H, Hart DA. Lithium chloride enhances survival of NZB/W lupus mice: influences of melatonin and timing of treatment. *Int J Immunopharmacol* 1995; 17:581-92.
31. Haunstetter A, Izumo S. Toward Antiapoptosis as a New Treatment Modality. *Circ Res* 2000; 86:371-6.
32. Holly TA, Drincic A, Byun Y, et al. Caspase inhibition reduces Myocine cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in-vivo. *J Moll Cell Cardiol* 1999; 31:1709-15.
33. Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, et al. Inhibition of interleukin 1 β converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94:2007-12.
34. Fink K, Zhu J, Namura S, et al. Prolonged therapeutic window for ischemic brain damaged caused by delayed caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18:1071-6.
35. Renahan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001; 322:1536-8.
36. de la Asuncion JG, Millan A, Pla R, et al. Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J* 1996; 10:333-8.
37. Sastre J, Millan A, Garcia de la Asuncion J, et al. A Ginkgo biloba extract (Egb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1998; 24:298-304.