



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**RAT BÖBREK DOKULARINDA SERBEST
RADİKAL METABOLİZMASININ ARAŞTIRILMASI:
MELATONİNİN ETKİSİ**

MUSTAFA NİSARİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2014



**RAT BÖBREK DOKULARINDA SERBEST RADİKAL
METABOLİZMASININ ARAŞTIRILMASI: MELATONİNİN ETKİSİ**

Mustafa NİSARİ

**DOKTORA TEZİ
TİBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2014

Mustafa NİSARİ tarafında n hazırlanan “Rat Böbrek Dokularında Serbest Radikal Metabolizmasının Araştırılması: Melatoninin Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Unvanı Adı SOYADI:

Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU

Anabilim Dalı, Üniversite Adı:

Tıbbi Biyokimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



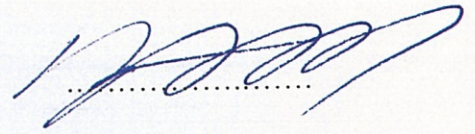
Başkan : Unvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. Aysel ARICIOĞLU

Anabilim Dalı, Üniversite Adı:

Tıbbi Biyokimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



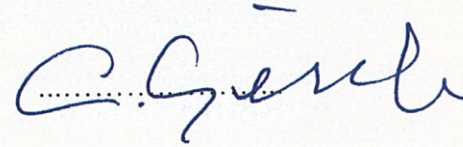
Üye : Unvanı Adı SOYADI:

Prof. Dr. Cemal ÇEVİK

Anabilim Dalı, Üniversite Adı:

Tıbbi Biyokimya , Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Unvanı Adı SOYADI

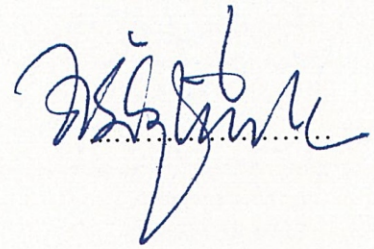
Prof. Dr. H. Serdar ÖZTÜRK

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Tıbbi Biyokimya, Ankara

Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



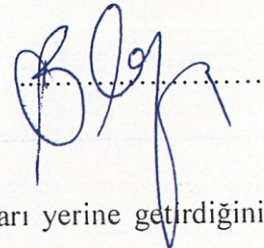
Üye : Unvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. A. Banu ÇAYCI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Tıbbi Biyokimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Tez Savunma Tarihi:14./07/ 2014

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Mustafa KEREM

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ☐ Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ☐ Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ☐ Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- ☐ Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ☐ Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Mustafa NİSARİ

02.07.2014

RAT BÖBREK DOKULARINDA SERBEST RADİKAL METABOLİZMASININ ARAŞTIRILMASI: MELATONİNİN ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Mustafa NİSARİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEMMUZ 2014

ÖZET

Serbest oksijen radikalleri iskemi reperfüzyon sırasında patofizyolojik doku değişimlerinde önemli bir bileşendir. Bu çalışmanın amacı iskemi reperfüzyon sonucu rat böbreğinde oluşan hasara karşı güçlü bir antioksidan olan melatoninin koruyucu etkisi incelendi.

Deneylerde 200-250g ağırlığında 28 adet dişi Wistar albino rat kullanıldı. Ratlar rastgele 4 gruba ayrılacak ve her grupta 7 hayvan olacak. I.Grup (n=7): Hayvanlara herhangi bir ilaç enjeksiyonu ya da iskemi reperfüzyon işlemi yapılmadı (Kontrol grubu). II.Grup (n=7): Herhangi bir ilaç enjeksiyonu yapılmadan sol renal arter 45 dakika iskemiye sokulacak ve iskemiden çıkarılıp reperfüzyonundan emin olduktan sonra kapatılarak, 24 saat yaşamalarına izin verildi (İskemi-reperfüzyon grubu). III.Grup (n=7): Hayvanlara, 25 mg/kg dozunda melatonin i.p olarak enjekte edildi ve iskemi reperfüzyon işlemi uygulanmadı (Melatonin grubu). IV.Grup (n=7): Gruptaki tüm hayvanlara 25 mg/kg dozunda melatonin i.p olarak enjekte edilecek ve enjeksiyondan bir saat sonra hayvanlar 45 dakika iskemiye sokuldu, iskemiden sonra reperfüzyonunda 24 saat yaşamasına izin verildi (İskemi-reperfüzyon+melatonin grubu).

SOD aktivitesi K-M, I/R-M ve I/R-(M+I/R) gruplarında kontrole göre anlamlı derecede düşük iken K-I/R ve M-(M+I/R) gruplarında ise anlamlı derecede yüksek olarak bulundu ($p<0.05$). Gruplar arası Katalaz aktivitesi incelendiğinde kontrol grubu diğer gruplar karşılaştırıldığında M+I/R grubunda artma söz konusu olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenirken ($p<0.05$) diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0.05$). Gruplar arası MDA düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre I/R ve M+I/R gruplarında artma, M grubunda ise azalma söz konusu iken istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0.05$). Glutasyon-s-transferaz enzim aktivitesi incelendiğinde, kontrol grubuna göre sadece I/R grubunda yükselme görülürken hem M hem de M+I/R gruplarında anlamlı bir azalma görülmekteydi ($p<0.05$). Çalışma sonuçları iskemiye bağlı böbrek hasarının azaltılmasında melatonin uygulamasının koruyucu etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Bilim Kodu : 1010.1
Anahtar Kelimeler : Rat,melatonin,iskemi
Sayfa Adedi : 89
Danışman : Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU

INVESTIGATION OF FREE RADICAL METABOLISM IN RAT TISSUES DURING ISCHEMIA-REPERFUSION: EFFECT OF MELATONIN

(Ph. D. Thesis)

Mustafa NİSARİ

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCE

JULY 2014

ABSTRACT

Oxygen free radicals are considered to be important components involved in the pathophysiological tissue alterations observed during ischemia±reperfusion (I/R). The purpose of this study was to investigate the effect of melatonin (MEL), potent antioxidant, on IR-induced renal injury in rats.

In this research we used 28 female wistar albino 200-250 g. The animals were randomly divided into 4 groups. Each experimental group was consisted of seven animals. Wistar albino rats were subjected to 45 min of renal pedicle occlusion followed by reperfusion. Melatonin (25 mg/kg i.p) was administered 30 min prior to ischemia and immediately before the reperfusion period. Group 1 (n=7): They were fed with only standard rat diet and tap water. Group 2 (n=7): Rats were subjected to 45 min of renal pedicle occlusion followed by 24 hours reperfusion. Group 3 (n=7): Melatonin (25 mg/kg i.p) was administered. Group 4 (n=7): Melatonin (25 mg/kg i.p) was administered 30 min prior to ischemia and immediately before the reperfusion period. Rats were subjected to 45 min of renal pedicle occlusion followed by 24 hours reperfusion.

Although we look to the activity of the enzyme SOD in the K-M, I/R-M ve I/R-(M+I/R) groups were estimated decreasing according to control group. K-I/R ve M-(M+I/R) groups were significant decreased ($p<0.05$). Between groups of catalase activity examined the control group and the other groups compared to M + I / R group, the increase comes not a statistically significant difference was observed ($p < 0.05$) in the other groups were not statistically significant ($p > 0.05$). Analyzing the MDA levels between groups compared to control group I / R and M + I / R groups increases, while there was a decrease in the M group were not statistically significant ($p > 0.05$). Glutathione-S-transferase enzyme activity is observed compared to control only the I / R group whereas an increase in both M and M + I / R group were observed in a significant reduction ($p < 0.05$). These results show that decreased kidney damage and treatment with MEL may prevent the kidney tissues damage result in ischemia.

Science Code : 1010.1
Key Words : Rat, melatonin, ischemia
Page Number : 89
Supervisor : Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak hazırlanan bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU'ya, eski tez danışmanım Prof.Dr.Orhan CANBOLAT'a, doktora eğitimim boyunca desteklerinin esirgemeyen Prof.Dr. Hatice Paşaoğlu'na, Prof.Dr. Cemal ÇEVİK'e ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'daki öğretim üyelerine, ayrıca çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Yrd.Doç.Dr.Arzu YAY, Erciyes Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Yrd.Doç.Dr.Tolga ERTEKİN'e, Arş.Gör.Özge AL'a, Genel Cerrahi Uzmanı Sayın Abdurrahman AKAY'a, Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezin'de görev yapan Zeynep SOYUER SARICA'ya ve Betül-Ziya EREN Genom ve Kök hücre merkezinde görev yapan Dilek CEYLAN'a her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim Mehtap NİSARİ ve biricik oğlum AHMET'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Boşaltım Sisteminin Gelişimi.....	3
2.1.1. Böbreklerin gelişimi:.....	3
2.2. İnsan Böbrek Anatomisi	3
2.3. Rat Böbrek Anatomisi	5
2.4. Böbrek Histolojisi.....	5
2.5. Oksidatif Stres	6
2.5.1. Serbest Radikaller	8
2.5.2. Serbest Radikal Kaynakları.....	12
2.5.3. Serbest Radikal Etkileri.....	14
2.6. İskemi-Reperfüzyon	19
2.6.1. İskemi	19
2.6.2. Reperfüzyon	21

2.7. Antioksidan Sistem.....	23
2.7.1. Endojen antioksidanlar	26
2.7.2. Eksojen antioksidanlar	26
2.8. Melatonin	33
2.8.1. Melatoninin fizyolojik etkileri- (SCN nöronları ve sirkadyen ritm üzerine etkileri).....	35
2.8.2. Eksojen melatonin uygulaması ile ritmin değişimi	36
2.8.3. Melatonin düzeylerinin yaşa bağlı değişimi.....	37
2.8.4. Hormonun Farmakokinetiği	37
2.8.5. Melatonin reseptörleri ve etki mekanizması	38
2.8.6. Biyoyararlanım ve yan etki	39
2.8.7. Melatonin Antioksidan Etkileri.....	39
2.8.8. Melatoninin İmmünolojik Etkileri	41
2.8.9. Melatonin'in bazı ilaç toksisitesini azaltıcı ve etkinliğini artırıcı etkileri.....	41
2.8.10. Kardiyovasküler sistem	42
2.8.11. Kemik koruyucu etki	42
2.8.12. Melatoninin SSS deki ve nörodejeneratif olaylara etkileri	42
2.8.13. Melatonin ve uyku.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Kullanılan Gereçler.....	45
3.1.2. Kullanılan Aletler	45
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	45
3.2. Uygulanan Yöntemler	46
3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	46
3.2.2. İskemi Reperfüzyon Tekniği	46
3.3. Yöntemlerin Uygulanması.....	49

3.3.1. Böbrek doku hücrelerinin homojenize edilmesi.....	49
3.3.2. Sıçan böbrek doku örneklerinde protein tayini	49
3.3.3. Sıçan böbrek doku örneklerinde Malondialdehit (MDA) tayini	50
3.3.4. Sıçan böbrek doku örneklerinde Katalaz (CAT) aktivitesinin ölçümü	52
3.3.5. Sıçan böbrek doku örneklerinde Süperoksid Dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü	53
3.3.6. Sıçan böbrek doku örneklerinde Glutatyon-S-Transferaz (GST) aktivitesinin ölçümü	54
3.4. Histopatolojik inceleme	55
3.4.1. Hematoksilen-Eozin ve PAS Boyama Yöntemi.....	55
3.4.2. TUNEL Boyama	55
3.5. İstatistiksel Analiz	56
4. BULGULAR.....	57
4.1. Biyokimyasal ve Histopatolojik Bulgular	57
4.2. Histopatolojik Bulgular	61
4.2.1. Hematoksilen-Eozin ve PAS ile boyanmış böbrek dokusu kesitleri	61
4.2.2. Apoptozun Değerlendirilmesi	63
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	65
KAYNAKLAR.....	73
EKLER	87
EK-1.Etik Kurul Raporu	88
ÖZGEÇMİŞ	89

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Böbreğin frontal kesiti	4
Şekil 2.2. Oksijen molekülünün orbital yapısı	8
Şekil 2.3. Vücuttaki önemli serbest radikaller ve serbest radikal hasarı	9
sonuçları	
Şekil 2.4. İ/R hasarında yer alan olaylar dizisi.....	23
Şekil 2.5. Radikallerin yol açtığı hücre hasarı	23
Şekil 2.6. Redükte Glutasyon (GSH).....	26
Şekil 2.7. Glutasyon redoks döngüsü	28
Şekil 2.8. Melatoninin kimyasal yapısı	34
Şekil 2.9. Karanlık/ aydınlık uyarı ile melatonin sentezinin düzenlenmesi	35
Şekil 2.10. Melatoninin ritim düzenleyici rolü	36
Şekil 2.11. Doku hasarına yol açan inflamatuvar yolda melatoninin etkileri	41
Şekil 3.1. Protein standart eğrisi.....	50
Şekil 3.2. TBA-MDA kompleksi oluşumu.....	50
Şekil 3.3. MDA standart eğrisi.....	51
Şekil 4.1. Kontrol, I/R, M ve M+I/R verilen rat böbrek dokularına ait SOD aktiviteleri.....	58
Şekil 4.2. Kontrol, I/R, M ve M+I/R verilen rat böbrek dokularına ait CAT aktiviteleri	59
Şekil 4.3. Kontrol, I/R, M ve M+I/R verilen rat böbrek dokularına ait GST Aktiviteleri.....	59
Şekil 4.4. Kontrol, I/R, M ve M+I/R verilen rat böbrek dokularına ait MDA düzeyleri.....	60
Şekil 4.5. Kontrol, I/R, M ve M+I/R verilen rat böbrek dokularına ait enzim aktiviteleri.....	60
Şekil 4.6. Her bir deneysel gruptaki TUNEL+hücre sayısı.....	64

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Radikal ve radikal olmayan reaktif türleri	7
Çizelge 2.2. Antioksidanların hidrofilik ve lipofilik özellikleri	25
Çizelge 3.1. GST ölçüm tablosu.....	54
Çizelge 4.1. Rat böbrek dokularına ait Ortalama $\pm$ Standart sapma olarak SOD, CAT ve GST enzim aktivite değerleri ile MDA miktarı	57

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. A-Ratın sakrifiye edilmesi, B-Böbreğin karın içerisinden çıkarılması C- Böbreğin kesilerek formaline konulması ve -80°C'ye kaldırılması ...	46
Resim 3.2. Sıçana insizyonun uygulanışı.....	47
Resim 3.3. A-Böbreğin karın boşluğundan çıkarılışı, B-Renal damara buldogun yerleştirilmesi, C-İskeminin başlaması, D-Reperfüzyon başladıktan sonra sıçanın dikilmesi	48
Resim 4.1. Her bir gruptaki sıçan böbrek kesitindeki ışık mikroskopundaki görüntüsü (H&E). A-Kontrol grubu B-Melatonin uygulanan grup C-I/R uygulanan grup, D-I/R ve melatonin uygulanan grup (H&E; büyüklük, x400).....	62
Resim 4.2. PAS ile boyanan kesitlerin fotomikrografik görüntüsü A-Kontrol grubu B- Melatonin uygulanan grup C-I/R uygulanan grup, D-I/R ve melatonin uygulanan grup (PAS; büyüklük, x400).....	62
Resim 4.3. TUNEL ve yeşil immunofloresan yansıtan hücreler.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
$^1\text{O}_2$	Singlet Oksijen
CAT	Katalaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Redükte Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GSSG	Okside Glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
MDA	Malondialdehit
MEL	Melatonin, N-asetil-5-metoksitriptamin
MPO	Miyeloperoksidaz
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Süperoksit Anyonu
$\text{OH}^{\cdot}$	Hidroksil Radikali
$\text{ROO}^{\cdot}$	Peroksil Radikal
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
$\text{RS}^{\cdot}$	Thiyl Radikali
SOD	Süperoksit Dismutaz
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NO_3^-	Nitrat
Ca^{2+}	Kalsiyum

Kısaltmalar**Açıklama****ATP**

Adenozin Trifosfat

NO

Nitrik oksit

NADPH

Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

GER

Granüllü endoplazmik retikulum

ADP

Adenozin Di Fosfat

SR

Serbest Radikal

İ.P.

İntraperitoneal enjeksiyon

S.C

Subkutan enjeksiyon

I/R

İskemi/reperfüzyon

SOR

Serbest Oksijen Radikalleri

PMNL

Polimorfonüveli Lökosit

ET

Endotelin

IL-1

Interleukin-1

RPM

Dakikadaki Dönme Sayısı

1. GİRİŞ

Arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadır. İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekmektedir. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açmaktadır [1]. Böbrek iskemisi; böbrek transplantasyonu, kısmi nefrektomi, kardiyopulmoner bypass, sepsis, çeşitli ürolojik girişimler ve hidronefrozis gibi çeşitli klinik durumlarda görülmektedir. İskemiden sonra gelişen akut böbrek yetmezliği, glomerüler filtrasyon hızında azalma, tübüler nekroz ve böbrek damarlarında direnç artışıyla karakterizedir [2].

İskemi ve reperfüzyon sonucu oksidatif stres oluşmaktadır. Dokularda oluşan oksidatif strese karşı endojen ve ekzojen antioksidanlar bulunmaktadır. Endojen antioksidanlardan biri olan melatonin başta pineal bez olmak üzere over, lens ve kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur [3].

Melatonin uyku, üreme sirkadiyen ritim ve immunité gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca in vivo ve in vitro çalışmalarla antiproliferatif ve antioksidan etkilere de sahip olduğu gösterilen melatoninin kanser ve yaşlanmanın engellenmesinde de etkili olabileceği öne sürülmüştür. Sentezini takiben pineal bezden doğrudan dolaşıma verilen melatonin lipofilik özelliğine rağmen membran reseptörleri aracılığı ile hedef hücrelere ulaşır. Lipofilik özelliğinden dolayı hücrenin tüm bölümlerine kolaylıkla girebilen melatonin için sitozolik ve nükleer bağlanma yerleri de tanımlanmıştır [4]. Melatonin hem su hem de lipid fazda çözünbildiğinden organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen melatonin için bilinen hiçbir bariyerin olmaması melatoninin tüm intraselüler komponentlere kolaylıkla ulaşılabilmesini sağlamaktadır. Böylece melatonin hücre

zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir. Hücre membranı ile temas ettiğinde fosfolipid tabakanın dış yüzeyine tutunan melatonin radikallerle önceden temas ederek onları detoksifiye eder ve membranı korur. Melatonin varlığında mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan radikallerin üretimi de azalmaktadır. Çekirdeğe kadar ulaşabilme özelliği DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında melatonine bir üstünlük sağlamaktadır [5].

Deney hayvanlarına uygulayacağımız melatoninin dozu insanlarda salgılanan melatonin miktarına (29 mg/gün) yakın ve yapılan literatür taraması sonucunda dişi sıçan üzerinde yapılan çok az çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda antioksidan bir hormon olan melatoninin böbrek iskemi reperfüzyon hasarında böbrekteki antioksidan enzim düzeyleri ile böbrekte histopatolojik değişiklikler üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu nedenle, sıçan böbreğinde iskemi reperfüzyon sonrası böbrek doku örneklerinde antioksidan superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), Glutasyon-S-transferaz (GST) enzim aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçülecektir. Ayrıca doku örnekleri histopatolojik olarak incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

Kan, hücrelere besin ve oksijen taşımaktadır. Hücreler oksijeni kullanarak karbondioksidi hücreler arası boşluğa bırakır. Kullanılan besinlerin artıkları da aynı boşluğa bırakılır. Hücreler tarafından dışarı atılan bu maddeler venlerle doku aralarından toplanarak karbondioksit akciğere diğer atıklar ise böbreğe getirilir. Böbreğe gelen vücudumuza zararlı olan atıklar burada nefronlar ile idrar halinde vücuttan uzaklaştırılır. Genel olarak atık maddelerin vücut dışına atılmasına boşaltım denir. Boşaltım sistemi homeostasis katılan önemli organ sistemlerinden biridir. Vücut sıvılarının hacim ve içeriğinin, kan, basıncının, pH'nın, su ve elektrolit dengesinin düzenlenmesi, hücrelerde metabolizma sonucu oluşan ve kana verilen atık ürünlerden, kanın temizlenmesi şeklindeki olaylar boşaltım sisteminin fonksiyonudur [6].

2.1. Boşaltım Sisteminin Gelişimi

Dördüncü haftanın başında somitlerle ilişkisini kaybeden intermediate mezoderm servikal ve üst torasik bölgelerde segmental dizilimli hücre kümelerini oluştururken, daha kaudalde segmentsiz bir doku kütlesi meydana getirir. **Nefrotom** olarak bilinen segmental hücre toplulukları sadece ilkel boşaltım tübüllerini oluştururlar ve hiçbir zaman görev yapmazlar. Torasik, lumbar ve sakral bölgelerde segmental yapısını kaybeden ve **nefrojenik kordon** adını alan mezodermden boşaltım tübülleri gelişir [7,8].

2.1.1. Böbreklerin gelişimi

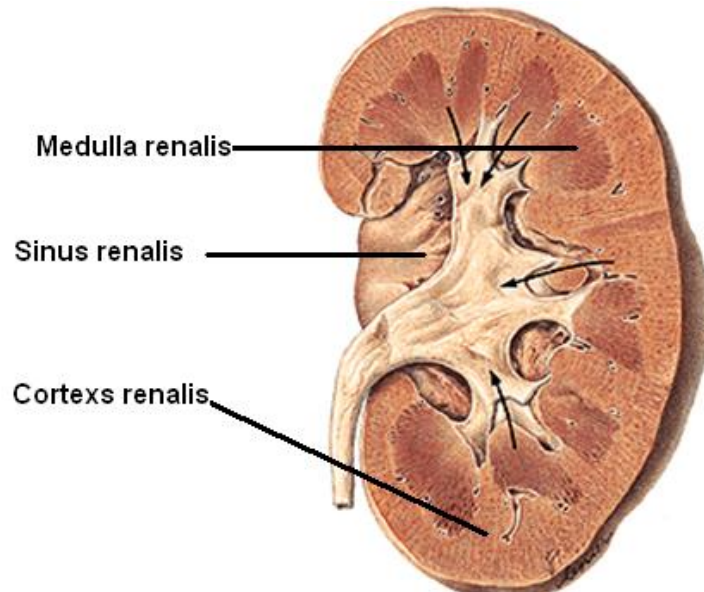
İnsan embriyosunda böbrekler, kranialden kaudale doğru farklılaşan ve intermediate mezodermin oluşturduğu **pronefroz**, **mezonefroz** ve **metanefroz** adı verilen üç sistemden gelişir. Pronefroz rudimenterdir ve görev yapmaz; ilkel balıklarda kalıcı böbreği oluşturur. Mezonefroz erken fetal dönemde kısa bir süre içinde görev yapar; kurbağa ve balıklarda kalıcı böbreği şekillendirirler. Metanefrozdan ise, insanda kalıcı böbrek oluşur [7,8].

2.2. İnsan Böbrek Anatomisi

Kandan idrarı süzen ve boşaltım kanallarına veren bir çift organdır. Kandaki üre ve metabolik artıkların atılması ile elektrolit ve su dengesinin sağlanmasında görev alır. Şekli kabaca fasulyeye benzer. Ortalama boyu 12 cm, eni 6 cm, kalınlığı 3 cm

kadardır. Ağırlığı erkeklerde 120-200 gr, kadınlarda ise biraz daha hafiftir. Rengi koyu kırmızı kahverengindedir. Böbrekler karın arka duvarına yaslanmış ve omurların her iki tarafında yerleşmişlerdir. Böbrekler Th₁₂ ve L₃ omurları seviyesinde bulunur. İnspirasyonda biraz aşağı ve expirasyonda biraz yukarı çıkar. Genellikle sağ böbrek, sol böbreğe nazaran biraz daha aşağıda yerleşmiştir. Böbrekler peritoneum'un arkasında (retroperitoneal) bulunur. Her iki böbrekte en dıştan ince bir örtü ile örtülmüştür. Bu örtünün altında, böbreği saran yağ tabakası vardır. Yağ kapsülünün de altında böbreği saran ince fibröz sağlam bir kapsül bulunur. Bu örtülerden sonra asıl böbrek dokusu bulunur. Böbreklerin ön ve arka olmak üzere iki yüzü, iç ve dış iki kenarı, üst ve alt iki ucu vardır. Dış kenarları konvektir ve iç kenarları konkavdır. İç kenarın ortasında böbreğe giren ve çıkan oluşumlar (a. v. renalis, pelvis renalis ile sinir ve lenf damarları) bulunur. Böbreklerin ön yüzleri sağda, sağ böbrek üstü bezi, karaciğer, kolon, ince bağırsaklar ve duodenum ile komşu iken, solda; sol böbrek üstü bezi, dalak, mide, pankreas, kolon ve ince bağırsaklar ile komşudur [9].

Böbreklerin yapısı, frontal kesitlerde böbrek parankiminde hem renk hem de yapı bakımından iki ayrı kısım görülür. Bunlardan biri cortex renalis olup dış tarafta yer alır ve içerisinde kandan idrarı süzen yapılar (corpusculum renale) bulunur. Diğeri ise iç kısımda yerleşmiştir ve medulla renalis adını alır. Burada toplayıcı kanallar bulunur. Medulla renalisten daha iç tarafta ve ortada bulunan boşluğa ise sinus renalis denir (Şekil 2.1) [6].



Şekil 2.1.Böbreğin frontal kesiti [10].

Sinus renalis'de calix renalisler, pelvis renalis ve damarlar bulunur. Calix renalis minorların 2-3 tanesi birleşerek calix renalis major'u oluşturur. Bunlar da kendi aralarında birleşerek pelvis renalis'i meydana getirirler. Huni şeklinde olan pelvis renalis, birinci bel omuru hizasında ureterle birleşir. Böbreklere günde ortalama olarak 1500 lt kan gelir. Bu kandan 1-2 lt idrar süzülür. Böbreklerde idrarı oluşturan en küçük birime nefron denir. Bunların sayısı her bir böbrekte 1.250.000 kadardır [6].

2.3. Rat Böbrek Anatomisi

Böbrekler karın arka duvarında yerleşim gösteren bir çift organ olup fasulye şeklindedir. Her bir böbreğin silindirik şeklinde ureter adı verilen bir kanalı bulunur. Ureter böbreğin medial kenarından damarlarla birlikte seyrederek ureter kaudalde arka kaslar boyunca uzanır. Pelvik kanalın yanında ventrale doğru döner ve vesiküler arteri takip eder. Bu kanal derinde erkek sıçanlarda duktus deferense doğru dişilerde ise uterus boynuzunda tekrar görünür ve mesanenin tabanından organ boşluğuna girer. İdrar geçici bir süre mesanede depo edilir. Genellikle mesane kontraksiyon yapar içeriğini korur. Mesane küçük armut şeklinde kas yapılı bir organdır. Vücudun orta hattında bir çift lateral mezenter aracılığıyla pelvik kanalın üst kenarına tutunur. Genellikle mezenter bir miktar yağ içerir ayrıca erkek sıçanlarda ise prostatın bir kısmını oluşturur. Tabanı yani boyun kısmı genişleyerek urethra'yı oluşturur [11].

2.4. Böbrek Histolojisi

Üriner sistem bir çift böbrek ve bir çift üreter ile tek bir mesane ve üretradan oluşur. Bu sistem, içinde çeşitli metabolik artık ürünlerin bulunduğu idrarı üreterek homeostazın devam etmesine yardımcı olur. Böbreklerden üretilen idrar üreterler aracılığı ile mesaneye geçerek burada geçici olarak depolanır ve daha sonra üretradan dışarı atılır. Böbrekler vücudun sıvı ve elektrolit dengesini de ayarlar, aynı zamanda renin ve eritropoetinin üretildiği yerdir. Renin kan basıncının düzenlenmesinde görev alırken eritropoetin kırmızı kan hücrelerinin üretimini uyarır [12].

Nefronlar; mikroskopik olarak böbreğin en küçük anatomik ve fonksiyonel ünitesidir. Bir nefron yaklaşık 50 µm uzunluğundadır ve her iki böbrekte yaklaşık 2,4 milyon kadar bulunur. Her biri kendi başına idrar yapma yeteneğindedir [12].

Bowman kapsülünün pariyetal tabakası ince bir retiküler lif tabakası ve bazal lamina ile desteklenen tek katlı yassı epitelden oluşur. İdrar kutbunda epitel, proksimal tübül için karakteristik olan tek katlı prizmatik epitele dönüşür. Glomerül kapillerlerinin endotel hücreleri ince bir sitoplazmaya sahiptir. Organellerin çoğu sitoplazmanın çekirdek çevresinde kalınlaştığı kısımda yoğunlaşmıştır [12].

Proksimal Kıvrımlı Tübüller; renal cisimciğin idrar kutbunda, bowman kapsülünün pariyetal yaprağının tek katlı yassı epiteli, proksimal kıvrımlı tübüllerde prizmatik epitelyum şeklinde devam eder [12].

Henle kulpu; henle kanalı proksimal kıvrımlı tübüllere yapıca çok benzeyen bir kalın inen kol, bir ince kol, bir çıkan kol ve yapıca distal kıvrımlı tübüllerle aynı olan bir çıkan koldan oluşan U şeklinde bir yapıdır [12].

Distal kıvrımlı tübül; henle kanalının çıkan kalın kolu kortekse girdiğinde histolojik yapısını korur ancak bükülerek nefronun son kısmı olan distal kıvrımlı tübülleri oluşturur. Bu tübül tek katlı kübik epitelle döşelidir [12].

Toplayıcı tübüller ve kanallar; distal kıvrımlı tübüllerden geçen idrar birbirlerine bağlanarak daha büyük, düz toplayıcı kanalları oluşturan toplayıcı tübüllere boşalır. Bu kanallar bellini papiller kanalları adını alır ve piramidlerin uçlarına doğru giderek genişler. Küçük toplayıcı tübüller, kübik epitelle döşelidir. Bu tübüller medullanın derinliklerine doğru indikçe hücrelerin boyu uzar ve prizmatik olur. Medullada gerçekleştirilen idrar yoğunlaştırma işleminde en önemli rolü toplayıcı kanallar oynar [12].

Jukstaglomerüler Aparat; renal cisimciğin hemen yanında afferent arteriyolün tunika mediasında modifiye düz kas hücreleri bulunmaktadır. Bu hücrelere jukstaglomerüler hücreler adı verilir. Bu hücrelerin çekirdekleri elips biçimindedir. Jukstaglomerüler hücrelerin salgısı kan basıncının sağlanmasında ayrıca

anjiotensinojen adı verilen plazma proteinini anjiotensin 1 olarak adlandırılan inaktif dipeptide dönüştürecek olan renin hormonu üretmektedir [12].

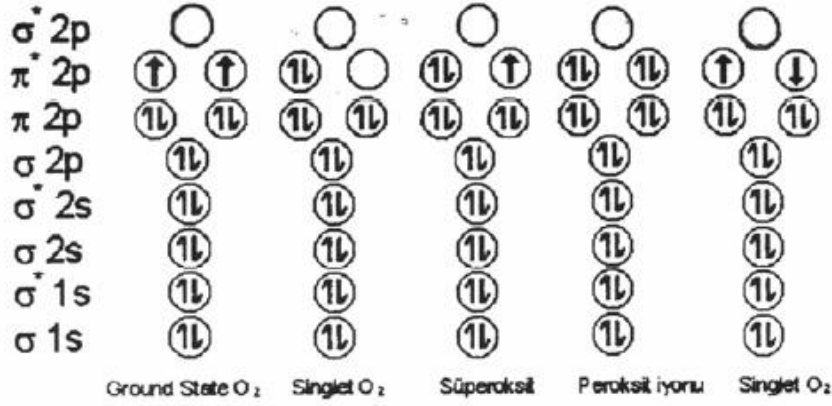
2.5. Oksidatif Stres

Serbest radikaller vücuttaki fizyolojik aktivitenin doğal bir ürünüdür. Serbest radikaller organizmanın doğuştan kazandığı oksidan-antioksidan denge olarak tanımlanabilecek bir seviyede tutulur. Bu dengenin bozulması oksidatif strese yol açar. Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS) ve sülfür merkezli radikaller oksidan sınıfına girer. Ancak tüm reaktif türleri radikal değildir. Radikal olan ve olmayan reaktif türleri Çizelge 2.1’de özetlenmiştir [13,14].

Çizelge 2.1.Radikal ve radikal olmayan reaktif türleri [15].

Reaktif Türleri	
Radikal	Radikal olmayan
Hidroksil ($\cdot\text{OH}$)	Peroksinitrit (ONOO^-)
Alkoksil ($\text{L(R)O}^\cdot$)	Hipoklorit (OCl^-)
Hidroperoksil ($\text{HOO}^\cdot$)	Hidroperoksit (L(R)OOH)
Peroksil ($\text{L(R)OO}^\cdot$)	Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)
Nitrik oksit ($\text{NO}^\cdot$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Süperoksit ($\text{O}_2^\cdot$)	Ozon (O_3)

Canlı organizma için önemli olan yapıları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücresel kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli klinik durumların patogenezinde rol oynayan serbest radikaller, atomik yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulundurarak, bağımsız olarak varolabilen moleküllerdir. Eşleşmemiş elektronun kazandırdığı en önemli özellik birçok radikal ile bu elektronun paylaşılabilmesidir [16-18]. Serbest radikallerin en önemli tepkimeleri, moleküler oksijen ve onun reaktif türlerinin olduğu tepkimelerdir. Şekil 2.2’de oksijenin orbital yapısı ve oluşan reaktif türleri görülmektedir [19].



Şekil 2.2. Oksijen molekülünün orbital yapısı [18].

Demir, bakır, mangan, molibden gibi geçiş metalleri de dış yörüngelerinde birer elektron taşımalarına rağmen radikal karakter göstermez. Serbest radikal kabul edilen atom ve moleküller elektron dağılımlarının yanı sıra termodinamik yapıları ve lokal kinetik reaktiviteleri ile değerlendirilir [20,21].

Antioksidan ise; okside olabilen substrata göre ortamda daha az derişimde bulunan ve bu substratın oksidasyonunu belirgin şekilde geciktiren veya engelleyen madde olarak tanımlanabilir. Bu tanıma göre antioksidanların fizyolojik rolü, serbest radikalleri içeren kimyasal tepkimelerin sonucunda hücresel bileşenlere gelebilecek zararı önlemektir [22]. Aerobik metabolizmada denge, serbest radikal oluşumu ve bunların benzer hızla antioksidan sistemler tarafından uzaklaştırılmasıyla karakterizedir. Geri dönüşümsüz oksidatif hasarın birikimi ile önce hücre daha sonra doku ve organ sistemlerinde yapısal ve işlevsel bozukluklar ortaya çıkabilir [23].

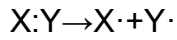
2.5.1. Serbest radikaller

Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir [24].

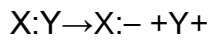
Serbest radikaller üç temel mekanizmayla oluşmaktadır [25,26].

a. Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ

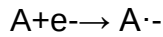
yapısındaki iki elektronun her biri farklı atomlar üzerinde kalır ise her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron kalır ve iki tane serbest radikal oluşur [25,26].



b. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi veya heterolitik bölünmesi ile: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Bu tipteki bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır ve serbest radikal değil iyonlar meydana gelir [25,26].

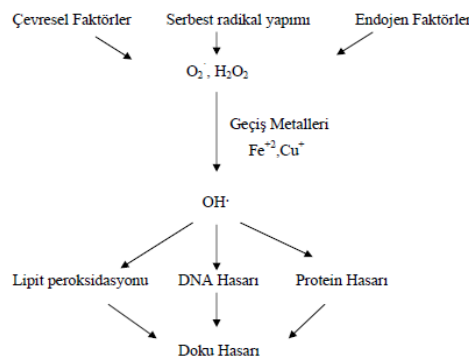


c. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi radikal formu olan supeksidin oluşumuna sebep olur [26].



Organizmada oksidatif strese neden olan radikal yapımı endojen ve çevresel faktörleri içeren çeşitli mekanizmalarla gerçekleşir (Şekil 2.3) [22].

Endojen faktörler mitokondriyal sızıntı, solunumsal patlama, enzim reaksiyonları, otooksidasyon tepkimeleridir. Çevresel faktörlerin başlıcaları ise sigara dumanı, hava kirliliği, ultraviyole ışınları, iyonize radyasyon ve ksenobiotiklerdir [22].



Şekil 2.3.Vücuttaki önemli serbest radikaller ve serbest radikal hasarı sonuçları [22].

Serbest radikallerin aerobik hücrelerde en önemli tepkimeleri moleküler oksijen ve onun reaktif türleri (süperoksit anyonu ve hidroksil radikali), peroksitler ve geçiş metallerinin olduğu tepkimelerdir [19].

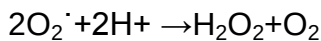
Reaktif oksijen türleri

Normal şartlarda oksijen kararlı, kokusuz, tatsız, renksiz, sudaki çözünürlüğü sınırlı bir gazdır. İnsan hayatı için hem gerekli hem de toksik olan bir moleküldür. Oksijenin iki eşleşmemiş elektronlarının ayrı orbitallerde aynı yönde dönmesi sonucunda oksijen radikale hale dönüşür. Moleküler oksijen elektron transferiyle suya kadar indirgenir. Bu yol 4 elektron gerektirir ve bu yolda reaktif ara moleküller oluşur. Bunlar süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksi radikalleridir. Bunlar önemli oksidatif stres ajanları olup reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılır [27,28].

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Oksijenli ortamda yaşam, oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi açısından önemli ölçüde yarar sağlarken bazı tehlikeleri de beraberinde getirir. Oksidatif fosforilasyonun ana bileşeni olan oksijene bir elektron eklenmesi ile süperoksit radikali oluşur [29]. Kendiliğinden, özellikle elektronca zengin bir ortam olan iç mitokondri zarında solunum zinciriyle birlikte oluşur. Süperoksit ayrıca iskemi-reperfüsyonda aktive olan ksantin oksidaz gibi flavoenzimlerce endojen olarak da oluşturulur. Lipooksijenaz ve siklooksijenaz ise diğer süperoksit oluşturan enzimlerdir [30-32]. Süperoksit ayrıca yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar gibi fiziksel ve kimyasal ajanlar ile bazı bileşiklerin otooksidasyonunda ve fagositozda oluşur [33]. Süperoksit kimyası çözelti ortamına bağlı olarak farklılıklar gösterir. Süperoksit sulu çözeltide askorbik asit, tiyol gibi molekülleri oksitleyebilen bir ajandır. Bunun yanında süperoksit güçlü bir indirgeyici ajan olup sitokrom c ve ferrik-EDTA gibi çeşitli demir komplekslerini indirgeyebilir [34].

Süperoksit, hidrojen peroksit ve moleküler oksijenin olduğu dismutasyon tepkimesinden dolayı sulu ortamda hızlıca kaybolur. Diğer taraftan SOD enzimiyle katalizlenen dismutasyon tepkimesi ise spontan dismutasyondan 109 kat daha hızlıdır [35].



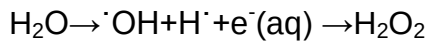
Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit serbest radikal olmamasına karşın biyolojik zarlara nüfuz edebilmesi ve daha reaktif oksijen türlerinin yapım aşamasında aldığı rolden dolayı önemlidir. Diğer bir önemli işlevi ise hücre içi sinyal molekülü olarak görev yapmasıdır [28]. Hidrojen peroksit süperoksit radikalının dismutasyon tepkimesi sonucu oluşur. Ürat oksidaz, glukoz oksidaz, d-aminoasit oksidaz gibi birçok enzim oksijene iki elektron transfer ederek direk hidrojen peroksit oluşturabilirler [25].

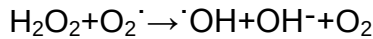
Hidrojen peroksitin redoks özelliği ve geçiş metalleri varlığında yüksek reaktif serbest radikalleri oluşturmaya karşı vücut, savunma sistemi geliştirmiştir. İstenmeyen hidrojen peroksit katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer oksidazlar ile hücreden uzaklaştırılır [34].

Hidroksil radikali (·OH)

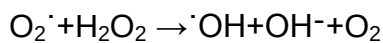
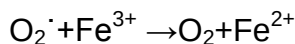
Hidroksil radikalının major oluşumu suyun yüksek enerji ile iyonizasyonudur.



Hidrojen peroksit ise süperoksit ile tepkimeye girerek en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



Bu tepkimeye Haber-Weiss tepkimesi denir ve tepkime katalizörsüz ortamda oldukça yavaşken, demirin katalizörlüğünde çok hızlıdır.



Katalizörlü tepkimede demir önce ferrik formdan (Fe³⁺) süperoksit ile ferröz forma (Fe²⁺) indirgenir. Ferröz form Fenton tepkimesi ile ferrik forma tekrar yükseltgenirken ·OH ve OH⁻ üretilir [34,36].

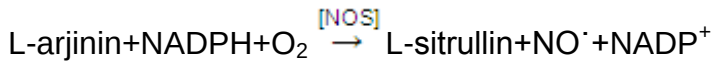
Singlet oksijen (¹O₂)

Singlet oksijen eşleşmemiş elektron içermediği için serbest radikal değildir. Bununla birlikte dönme yönlerinin farklılığından dolayı oksijenin yüksek reaktif formudur [34].

Moleküler oksijende paylaşılmamış iki dış elektron aynı yönde, aynı yörüngelerdedir. Singlet oksijende ise elektron dönme yönleri birbirine zıttır ve oluşturdıkları delta veya sigma formuna göre aynı veya ayrı yörüngelerde bulunurlar. Aynı yörüngede ise delta singlet oksijen, ayrı yörüngelerde iseler sigma singlet oksijen formu oluşur. Sigma formu delta formuna göre daha enerjetik olup kolayca delta formuna dönüşebilir [18,37].

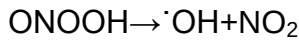
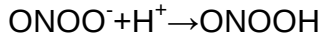
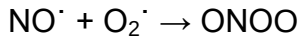
Nitrik oksit (NO[•])

NO[•] enzimatik olarak nitrik oksit sentaz enzimi tarafından L-arjinin'den sentezlenir.



NO[•] eşleşmemiş elektron bulundurmasına rağmen birçok biyomolekül ile kolayca tepkimeye giremez, öte yandan peroksil, alkil gibi diğer serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek daha az reaktif moleküller oluşturur [28].

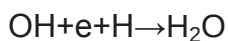
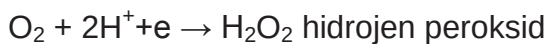
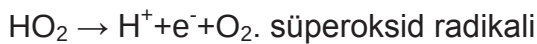
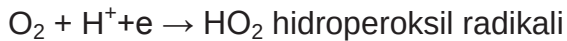
Yüksek miktarlarda O₂[•] yapımı NO[•] ile paraleldir ve birbirlerini etkileyerek [•]OH ve [•]NO₂ oluşumuna neden olurlar. Tepkime sırasında ise peroksinitrit (ONOO⁻) ve peroksinitröz asit (ONOOH) ara ürünleri oluşur [28].



2.5.2. Serbest Radikal Kaynakları

Oksijen

Aerobik metabolizması olan memelilerdeki başlıca serbest radikal kaynağı, oksijenin suya indirgenmesi sırasında yer alan tek elektron aktarmaları sonucunda oluşan reaktif partikülleridir. Bu reaksiyonlar sırası ile



Superoksit radikali; kuvvetli bir indirgeyici ajandır. Hızlı bir şekilde dismutasyona uğrayarak H₂O₂ ve O₂ oluşturur. Protonlanmış şekli olan hidroperoksil radikali

(HO₂) daha kuvvetli bir oksidandır. H₂O₂ ise zayıf bir oksidoredüktandır. Ortamda transisyon metalleri (Fe, Cu gibi) olmadığında oldukça sabittir. Katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) tarafından parçalanır. OH radikali; lipid peroksidasyonunu uyaran başlıca radikal olup superoksid radikalinden veya Fe iyonları etkisi ile H₂O₂'den oluşur [38].

Aktive nötrofiller

Hipoklorik asid aktive nötrofillerden üretilen güçlü bir oksidandır. Fagosit sitoplazmasında bulunan ve HEM içeren bir enzim olan miyeloperoksidaz (MPO), H₂O₂ ve Cl iyonlarından hipoklorik asid (HOCl) oluflumunu katalize eder. HOCl superoksid radikali veya demir tuzları ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur [38].

Nitrik oksid

Nitrik oksid ve nitrojen dioksid tek sayılı elektron taşıyıcı, bundan dolayı da serbest radikallerdir. Nitrik oksit kendisi zayıf bir indirgeyici ajan olmasına karşın endojen serbest radikaller ile birleşerek peroksinitrit radikalini meydana getirir. Bu güçlü bir oksidan olup kolaylıkla hidroksil radikalini oluşturabilir [38].

Mitokondriyal elektron transport sistemi

Mitokondride oksijenin suya indirgenmesi sırasında iç membranda lokalize elektron transport zincirinin bir bölümünün otooksidasyonu ile süperoksid radikali oluşur [38].

Endoplazmik retikulum

Bu hücre içi membranlar sitokrom P 450 ve sitokrom b5 sistemlerini içermektedirler. Bu sistemler doymamış yağ asitlerinin ve ksenobiyotiklerin oksidasyonunda rol oynar. Bu reaksiyonların oluşumu sırasında serbest radikaller meydana gelir [38].

Peroksizomlar

Peroksizomlar yüksek oranda oksidaz içerdiklerinden güçlü bir hücresel H₂O₂ kaynağı oluştururlar. Bu peroksizomal enzimler arasında; D-Aminoasid oksidaz, ürat oksidaz, acil-KoA oksidaz bulunmaktadır [38].

2.5.3. Serbest Radikallerin Etkileri

DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri

İyonize radyasyondan kaynaklanan hücre mutasyonları ve ölüm, serbest radikallerin DNA ile reaksiyonu ile oluşur. Bu olaydan özellikle hidroksil radikali sorumlu tutulmaktadır. Nükleik asit-baz değişimleri ve DNA'da zincir kırılmaları sitotoksiste'ye neden olur. Tamir sistemlerindeki yetersizlik sonucu mutasyonlar gelişir [39,40].

Proteinlere etkileri

Proteinler, radikallerin etkilerine lipitlere oranla daha az hassastır ve amino asit dizilişlerine bağlı olarak etkilenirler. Özellikle doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle etkileşimi yüksektir. Bu nedenle triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenirler. İmmungulobin G ve albumin gibi disülfid bağı fazla olan proteinlerin ise üç boyutlu yapıları bozulur [34,36,41].

Karbohidratlara etkileri

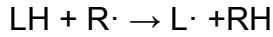
Monosokkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitler meydana gelir. Açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek etki eder ve böylece kanser ve yaşlanmaya neden olabilirler [41].

Serbest oksijen radikalleri bağ dokunun önemli bir bileşeni olan hiyalüronik asit gibi karbohidratların parçalanmalarına da yol açabilirler [29].

Lipitlere etkileri

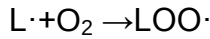
Serbest radikallerin biyolojik dokulardaki doymamış yağ asitlerine etkileri lipit peroksidasyonu olarak bilinir. Biyolojik zarların yapısı lipit ve proteinden oluşmaktadır, lipit peroksidasyonu lipitlere olduğu kadar zar proteinlerine de zarar verir [18]. Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, malondialdehit, etan ve pentan gibi ürünlere yıkılma tepkimelerine denilmektedir. Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonrasında açığa çıkan ürünler zar geçirgenliğini ve akışkanlığını ciddi şekilde etkileyip hücre ve organel içeriklerinin ayrılmasına neden olan kopma ve kırılmalara yol açar. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen zar hasarı geri

dönüşümsüzdür [29,34]. Zincir reaksiyonu şeklinde olan lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan radikal etkisiyle çoklu doymamış yağ asitleri üzerindeki metilen grubundan bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bu reaksiyon başlangıç reaksiyonu olarak isimlendirilir. Hidrojen atomu uzaklaşması ile karbon atomu üzerinde eşleşmemiş elektron kalır ve bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipit radikali($L\cdot$) niteliği kazanır [13,29,34,42].

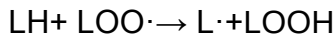


Oluşan lipit radikalının molekül içi çift bağlarının pozisyonunun değişmesiyle konjuge dienler oluşur. Bir alkenin iki çift bağı arasında bir tane tekli bağ varsa bu yapı konjuge dien olarak isimlendirilir. Bu şekilde moleküler düzenleme sağlanmış olur.

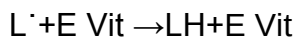
Lipit radikalının moleküler oksijen ile etkileşmesi sonucu lipit peroksil radikali ($LOO\cdot$) oluşur.



Peroksil radikali diğer komşu yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşmasına neden olurken kendisi de açığa çıkan hidrojen atomunu alarak lipit hidroperoksitlerine ($LOOH$) dönüşür. Böylece peroksidasyon başladıktan sonra kendi kendine yayılabilmekte ve çok sayıda yağ asidi zinciri lipit hidroperoksitlerine dönüşebilmektedir. Bu tepkime ilerleme reaksiyonu olarak isimlendirilir [13,29,34,42].



Oldukça kararlı olan lipit hidroperoksitleri lipit peroksidasyonunun ilk ürünüdür. Lipit peroksidasyonunun sürekli olarak devam ettiği durumlarda E vitamini gibi zincirleme tepkimeyi sonlandırıcı bir antioksidan ile lipit peroksidasyonu sonlanabilir [43].



Geçiş metalleri varlığında lipit hidroperoksitleri bu metallerin redoks döngüsüyle birlikte lipit peroksidasyonunu başlatabilecek radikallerin oluşumuna neden olabilir. Lipitlerden araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipit peroksidasyonu”, diğer radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna ise “non-enzimatik lipit peroksidasyonu” denir. Lipit peroksidasyonunun son bileşeni olan MDA peroksidasyona uğramış çoklu doymamış yağ asitlerinin bölünmesiyle oluşan üç karbonlu bir dialdehidtir ve oksidatif durumun göstergesi olarak yaygın kullanılır. Bu dialdehid biyolojik ortamda makromoleküllerin NH_2 ve/veya SH gruplarına bağlı veya serbest olarak bulunur. Oluşan MDA; deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi zar özelliklerinin değişmesine yol açar [29,44].

Polimorf nüveli lökositler (PMNL)

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik antinötrofil serumlarla ya da lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabilitedeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir [19]. İ/R ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir. Diğer taraftan, PMNL yüksek miktarda SOR üretme kapasitesine de sahiptir. İskemi reperfüzyon hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür [21]. Bunlar mikrovasküler oklüzyon, SOR salınması, sitotoksik enzim salınması, vasküler permeabilite artışı ve sitokin salınmasında artış şeklinde sıralanabilir. PMN'lerin aktivasyon ve migrasyonları endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığıyla olur. Selektinler olarak bilinen adhezyon moleküllerinin L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır. İ/R, endoteldeki P-selektin ekspresyonunu artırır. Bu molekül, PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur (lökosit rolling). İkinci aşamada, lökosit beta2 integrinler (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ile endoteldeki interselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) arasındaki etkileşim sonucunda lökosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşama ile, trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü 1 (PECAM-1) ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gerçekleşir. Aktive lökositler damar dışına ulaştınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlar

(kemotaksis) [22]. Nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gerekli kemotaktik maddeler arasında C3a ve interlökin-1 (IL-1), lökotrien B4 (LT-B4), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve prostaglandin (PG) türleri vardır. Aktif lökositler nükleer transkripsiyon faktörlerinin (NF-kB) aktivasyonuna ve tümör nekrozis faktör (TNF-a) sentezine yol açar [20]. Lökositlerin ürettiği serbest radikallerle etkileşen bu maddeler, mast hücrelerinden selektin ve ICAM gibi adhezyon moleküllerini mobilize eden inflamatuvar mediyatörlerin salınmasını uyarırlar. Aktif nötrofiller salıverdikleri maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra, damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olur [45].

Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozisin gelişmesi, normalde immün sistemin ve vücut homeostazının vazgeçilmez bir bileşenidir [23]. Hücre ölüm yolağındaki düzensizlikler, iskemi-reperfüzyon hasarının yanı sıra, kanser, otoimmün hastalıklar, immün sistem bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklara da yol açabilmektedir. Dokuda aktive lökositlerin başlattığı yanıt şu mekanizmalar ile gerçekleştirilir: Fosfolipaz A₂ aktivasyonu araşidonik asit metabolitleri (prostaglandinler ve lökotrienler) sonucu üretilir [25,46]. Lizozomal enzimler salgılanarak degranülasyon sonucu SOR üretimi gerçekleşir. Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü araçlarıdır ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirirler. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya yoğunluğunu azaltmaya yönelik bu inflamatuvar yanıt sonucu, mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptoza uğrar ve lenfatik dolaşım yoluyla makrofajlar aracılığıyla ortamdan uzaklaştırılır [45,46]. İskemik dokunun reperfüzyonu, endotele bağlı olarak arteriyollerde dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunu artırır. Post-kapiller venüllerde ise plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına ve mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına neden olur. Reperfüzyonun başlangıç döneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive edilmiş endotel hücrelerinden fazla miktarda O₂ oluşurken NO oluşumu ise azalır. Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması, endotel hücrelerinden PAF, TNF- α gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılık eden adhezyon moleküllerinin

biyosentezinin artmasına neden olur [25,26]. Serbest radikallerin oluşumunda ve İ/R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz ezimlerini içerir. Bu enzimler oksidan doku hasarında aktive nötrofillerde ksantin-oksidad'ın artması ile SOR'un salınması sağlar. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile dokuya gelen oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Genellikle süperoksit iyonu spontan dismutasyonla hidrojen peroksida dönüşür. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında miyeloperoksidaz enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girebilir [47].

Endotel hücresinin rolü

İ/R hasarının oluşmasında endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumundayken diğer taraftan da SOR üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET)'i ve NO'yu üretir. NO arteriyel dolaşımda ET'in vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İ/R hasarında endotelin/NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur. Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir; lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak IL-1, PAF, prostaglandinler (PG I2, PG E2), GM-CSF, büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A2 (TxA2) salgırlarlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılaya yeteneğindedir [48]. Nitrik oksitlerin radikal olarak reaktivitesi düşüktür, ancak metal içeren bileşikler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girerler. Özellikle lipid radikallerle tepkimeye girmesi NO'ya antioksidan bir etki kazandırır. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'in dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücrel moleküllerin

nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna yol açarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına neden olabilirler [49].

2.6. İSKEMİ-REPERFÜZYON

2.6.1. İskemi

İskemi; dokunun oksijen (O_2) ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin dolaşımla sağlanamaması ve bu süreçte oluşan atık ürünlerin yine dolaşımla uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır. İskemik hasarın derecesi hipoksinin derinliğine ve şiddetine bağlıdır. Sonuçta iskemiye bağlı doku hasarında hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi hücre ölümüne yol açmaktadır. İskemi sonucunda reversible ve irreversible olmak üzere 2 türlü hasar meydana gelir.

Reverzible (Geri Dönüşümlü) Hasar

Üç veya dört dakikalık iskemi, yüksek enerjili fosfat olan fosfokreatinin ile adenosin trifosfat (ATP) depolarının boşalması ve enerji bağımlı membran iyon pompalarının normal iyon gradiyentini gerçekleştirememesine sebep olur. Hipoksi ilk olarak hücrenin aerobik solunumunu yani mitokondrilerde meydana gelen oksidatif fosforilasyona etki eder. O_2 basıncının azalması hücre içi ATP azalmasına dolayısıyla hücre içindeki birçok sistemleri etkiler. Plazma membranının ATP enerjili sodyum (Na^+) pompası'nın aktivitesi azalarak Na^+ 'un hücre içinde birikimi ve potasyumun (K^+) hücre dışına geçişine neden olur. Na^+ artışı suyun izoosmotik artışı ile birlikte olup akut hücresel şişmeye neden olur. Bu şişme, inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleozitleri gibi diğer metabolitlerin birikimi ile artan ozmotik yükü daha da artır [52].

Hücresel ATP'de azalma ile birlikte adenosin monofosfattaki (AMP) artış fosfofrüktokinaz enzimini uyararak anaerobik glikoliz hızını artırır ve hücre için gerekli olan enerji sağlanır. Aerobik glikolizin durması ve anaerobik glikolizin devam etmesi sonucunda, aerobik glikolizle elde edilen ATP'nin ancak % 7'si elde edilmektedir [53]. Böylece glikojen hızla tükenir ve bu durum histolojik olarak karbonhidratların boyanmasının (örneğin periodik asit-Schiff [PAS] boyası) azalması ile gösterilebilir. Artan glikoliz de fosfat esterlerinin hidrolizi ile laktik asit

ve inorganik fosfatların birikimine neden olarak hücre içi pH'nın düşmesine yol açar [54].

Bir başka hasar ise ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan (GER) ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinde azalmadır. Hipoksi düzelmez ise mitokondrial fonksiyonun daha da kötüleşmesi ve membran permeabilitesinin artması daha fazla morfolojik bozulmaya neden olur. Hücrenin ana hatları, mikrovilluslar gibi ultrastrüktürel özelliklerin kaybı ve hücre yüzeyinde kabarcıkların oluşumu ile bozulur. Mitokondriler, endoplazmik retikulum ve gerçekte tüm hücrelere ozmotik regülasyonun kaybından dolayı çoğunlukla şişmiş görünür. Eğer O₂ eski seviyesine dönerse tüm bu değişimler reversibledir, bununla beraber eğer iskemi devam ederse irreversible zedelenme gelişir [55].

İrreversible (Geri Dönüşümsüz) hasar

Morfolojik olarak irreversible hasarlanmada mitokondrilerin daha şiddetli vakuolizasyonu ve mitokondri matriksinde, kalsiyumdan (Ca²⁺) zengin yoğunlukların birikimine aynı zamanda plazma membranlarının geniş hasarına ve lizozomların şişmesine de neden olur. Özellikle iskemik alan yeniden kanlandırılırsa hücre içine Ca²⁺ akışı olur ve Ca²⁺'a bağlı değişiklikleri ortaya çıkarır. Aşırı geçirgen membranlardan proteinlerin, esansiyel koenzimlerin ve ribonükleik asitlerin kaybı devam eder. Hücrelerden ATP'nin oluşumu için önemli metabolitler de geçebileceğinden hücre içi yüksek enerjili fosfatlar daha fazla azalır. Lizozomal membranların zedelenmesi enzimlerin sitoplazma içine geçmesine yol açar. Asit hidrolazlar, iskemik hücrenin azalmış hücre içi pH'sında aktifleşerek sitoplazmik ve nükleer elemanları parçalar. Hücre ölümünden sonra hücre sel elemanlar lizozomal hidrolazlarla sindirilmeye devam eder. Hücre sel enzimlerin hücre dışına yaygın olarak geçmesinin yanı sıra interstisyumdaki hücre dışı makro moleküllerin de hücre içine geçisi söz konusudur. Ölü hücreler sonunda "myelin şekiller" olarak tanımlanan büyük helezon şeklinde fosfolipid kitleleri haline dönüşebilir. Bu fosfolipid çöktürler daha sonra ya diğer hücreler tarafından fagosite edilir veya yağ asitlerine parçalanır. Bu yağ asitlerinin kalsifikasyonu Ca²⁺ sabunlarının oluşumuna sebep olur. Hücre içi proteinlerin parçalanarak hücre membranından geçerek periferik dolaşıma katılması kan serum örneklerinde dokuya özgü hücre hasarının bir göstergesidir [56].

İrreversible hasar mekanizmaları

Hipoksi için yukarıda tanımlanan olaylar dizisi en başından itibaren ölümcül olarak zedelenen hücrenin lizozomal enzimlerle sindirimine kadar bir bütün gibidir. İrreversibilitiyi iki olay belirler. Birincisi mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun (oksidatif fosforilasyon ve ATP üretiminin kaybı) kan akımı ve/veya oksijenlenmenin düzelmesinden sonra da geri döndürülmesindeki yetersizlik, ikincisi ise membran fonksiyonlarında ileri derecede bozukluğun gelişimidir [57].

Hücrenin hasarlanma mekanizmalarında 4 ana sistem etkilenir. Bunlar:

- 1- Hücre membran bütünlüğü, hücre ve organellerinin iyonik ve osmotik dengesi
- 2- Aerobik solunum, mitokondrial oksidatif fosforilasyon ve ATP oluşumu
- 3- Protein sentezi
- 4- Hücrenin genetik aparatı

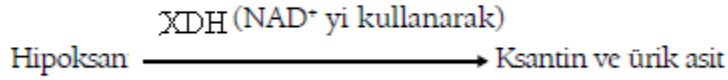
2.6.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon, kan akımının ve bununla birlikte O₂'nin hipoksik dokuya tekrar geri dönmesi anlamına gelir. Eğer hücre irreversible şekilde hasara uğramadıysa, bu sayede enerji depoları ve hücresel homeostazis geri kazanılmış olur [58]. Reperfüzyon iskemisinin tek başına oluşturduğu hasardan çok daha fazla hasar oluşturabilir [59].

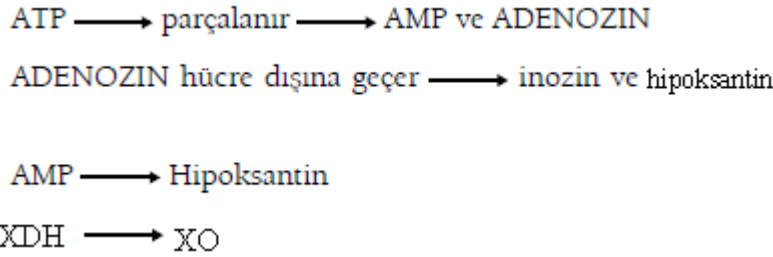
Ksantin oksidoredüktaz, hipoksantin gibi pürinlerin iki aşamalı oksidasyonu ile ksantin üzerinden ürate dönüşmesini sağlayan bir enzimdir. İn vivo olarak bu enzim, dehidrogenaz (D şekli) ve oksidaz (O şekli) olarak iki şekilde bulunabilir. Dehidrogenaz şekli serbest oksijen radikali oluşumuna neden olmazken, oksidaz şekli elektron kabul edici olarak moleküler oksijeni kullanır ve süperoksit (O₂⁻) radikalinin ortaya çıkmasına neden olur. Ksantin oksidoredüktaz'ın normal dokularda dehidrogenaz şekli bulunurken iskemi, irreversible proteoliz ve yan grupların reversible oksidasyonu sonucunda oksidaz şekline dönüşebilir [60,61]. İskemi ile hücre içindeki ATP ve ADP gibi yüksek enerjili adenin bileşikler AMP'ye indirgenir. Sonuçta hücre içi AMP konsantrasyonu artar. Artmış bulunan AMP'den adenosin ayrılır. Adenosin sırayla inozin ve hipoksantine dönüşür. ATP azalması nedeniyle membranların iyon gradiyentini koruyamaması nedeniyle hücre içine

Ca^{++} girişi olur [62]. Hücre içine giren Ca^{++} , proteazları aktive ederek ksantin dehidrogenazdan ksantin oksidaz oluşmasını sağlar. Ksantin oksidaz aracılığı ile de hipoksantinden ksantin, bundan da geri dönüşümsüz olarak ürik asit oluşur. Reperfüzyon sırasında dokuya gelen bol miktarda O_2 molekülünden, bu reaksiyonlar sırasında süperoksit ve hidrojen peroksit (O_2^- , H_2O_2) oluşur. Bununla birlikte hipoksantin yıkılmaya başlamadan önce, yeterli oksijen akımı sağlanırsa, hipoksantin ve diğer bileşiklerden tekrar ATP oluşur [54,62]. İskemi ve reperfüzyonda meydana gelen biyokimyasal mekanizma aşağıda özetlenmiştir.

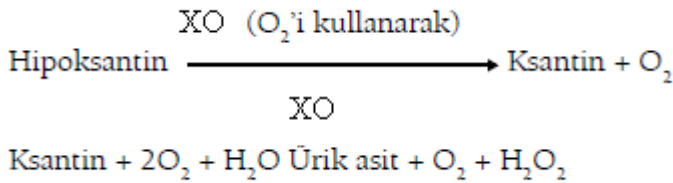
Normal şartlarda:



İskemide:

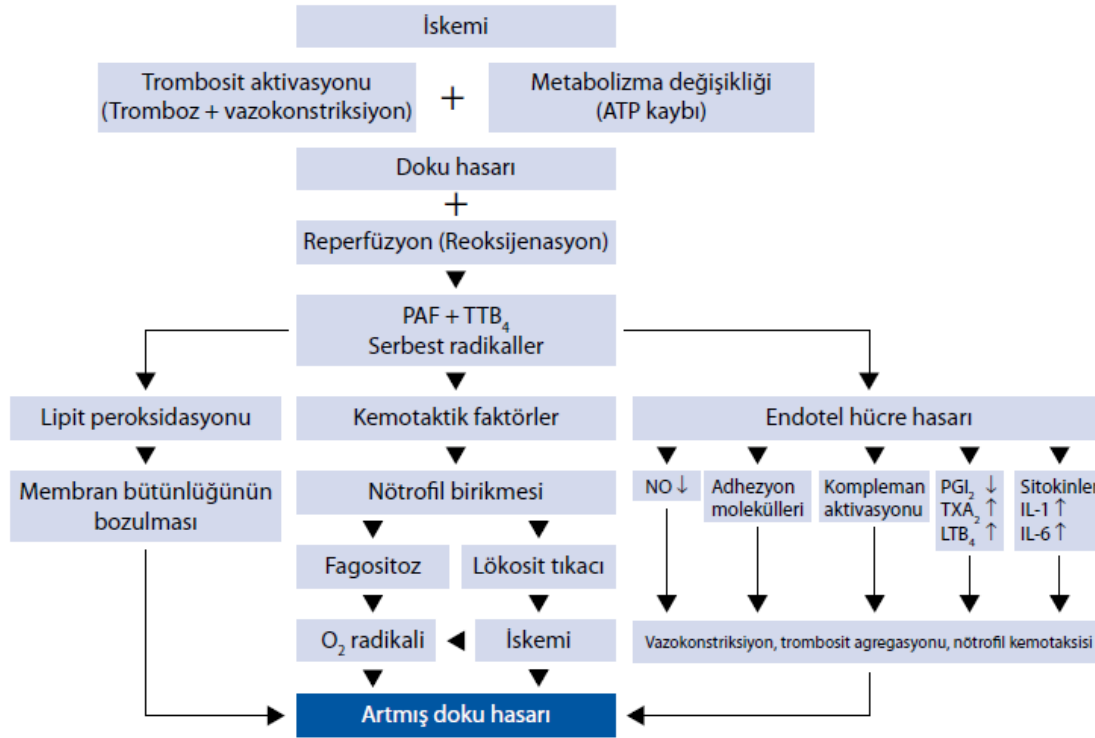


Reperfüzyon ile:



İskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücrel ve humoral olaylar serisidir [63,64].

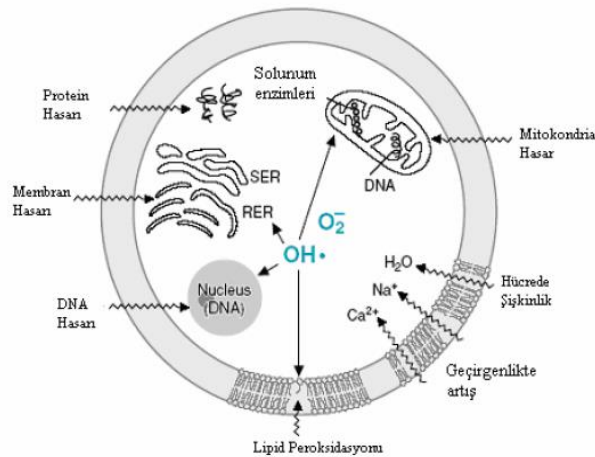
Özellikle; serbest oksijen radikalleri, polimorf nüveli lökositler (PMNL), kompleman sistemi ve endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktör hasarın nedenleri arasında yer almaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4.İ/R hasarında yer alan olaylar dizisi [65].

2.7. Antioksidan Sistem

Vücutta serbest radikallerin normalin üzerinde oluşumunun engellenmesi ve bu radikaller nedeniyle oluşan hasarların önlenmesi amacıyla gelişmiş savunma sistemine antioksidan savunma sistemi ya da antioksidanlar denir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5.Radikallerin yol açtığı hücre hasarı [66].

Antioksidanlar; endojen-eksojen kaynaklı, serbest radikal oluşumunu önleyenler-mevcut radikalleri etkisizleştirenler; enzim olan-enzim olmayanlar şeklinde farklı olarak sınıflandırılmaktadır.

a-Toplayıcı (scavenging) etki: Serbest oksijen radikallerini tutarak zararlı etkilerini engelleme veya zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine denir. Antioksidan enzimler, trakeobronşial mukus ve küçük moleküller bu tür etki göstermektedir.

b- Bastırıcı (quencer) etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan ya da inaktif şekle dönüştüren olaya denir. Vitaminler, flavanoidler, trimetazidin ve antosiyanidler bu tür etkiye sahiptirler.

c- Onarıcı (repair) etki: Serbest oksijen radikallerinin yarattıkları hasarlar onarıcı etki sayesinde onarılır.

d- Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyen etki olup; hemoglobin, seruloplazmin ile minerallerin etki gösterme tarzıdır [36]. Hücre ve organ sistemlerini reaktif oksijen türlerine karşı koruyabilmek için organizma karmaşık bir sistem geliştirmiştir. Bu sistem endojen ve eksojen orjinli, etkileşimli ve birlikte çalışan çeşitli bileşenler içerir [36]. Antioksidan sistem hasar öncesi radikal oluşumunu önleyerek oksidatif hasarı onarır, hasara uğramış molekülleri temizler ve mutasyonları önler. Nötralize olması gereken çeşitli reaktif ara ürünleri ve indirgenmesi gereken okside biyomolekülleri etkileyen hem lipofilik hem hidrofilik fazda pek çok antioksidan Çizelge 2.2’de özetlenmiştir [66,67].

Çizelge 2.2.Antioksidanların hidrofilik ve lipofilik özellikleri [66].

Antioksidan	Faz	Etki
Süperoksit Dismutaz(SOD)	Hidrofilik	$O_2^{\cdot -}$ 'nin H_2O_2 ve O_2 'e dismutasyonu
Katalaz(CAT)	Hidrofilik	H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'e dismutasyonu
Glutasyon peroksidaz(GSH-Px)	Hidrofilik veya Lipofilik	R-OOH'nin R-OH indirgenmesi
Glutasyon redüktaz (GSH-Rd)	Hidrofilik	Okside glutasyonun indirgenmesi
Glutasyon S Transferaz (GST)	Hidrofilik	R-OOH'nin GSH ile konjugasyonu
Metallotieninler	Hidrofilik	Geçiş metalleriyle nötralizasyon
Tiyoredoksinler	Hidrofilik	R-S-S-R'nin R-SH'a indirgenmesi
Glutasyon	Hidrofilik	R-S-S-R'nin R-SH'a indirgenmesi Serbest radikal temizleyicisi GSH-Px ve GST'nin kofaktörü
Ubikinon	Lipofilik	Serbest radikal temizleyicisi Lipid peroksidasyonunda korun
Askorbik asit	Hidrofilik	Serbest radikal temizleyicisi Tokoferol kazanımı Enzimlerin redükte formda korunması
Karotenler	Lipofilik	Serbest radikal temizleyicisi $O_2^{\cdot -}$ baskılayıcı
Tokoferol	Lipofilik	Selenyum absorpsiyonunu artırır Serbest radikal temizleyicisi Lipid peroksidasyonunda korun
Selenyum	Amfifilik	Tiyoredoksin, GSH-Px yapıtışı

Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere ikiye ayrılırken endojen antioksidanlar da enzim olan ve enzim olmayan olmak üzere kendi arasında ikiye ayrılır. Antioksidanların sınıflandırılması aşağıda sıralanmaktadır.

2.7.1. Endojen antioksidanlar

Enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Enzim olan endojen antioksidanlar

Glutatyon peroksidaz (GSHPx), SOD, GST, CAT, Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Hidroperoksidaz [65].

Enzim olmayan endojen antioksidanlar

Melatonin, Seruloplazmin, Transferin, Miyogloblin, Hemoglobin, Ferritin, Bilirubin, glutatyon, Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin, Albümin [65].

2.7.2. Eksojen antioksidanlar

Vitamin eksojen antioksidanlar

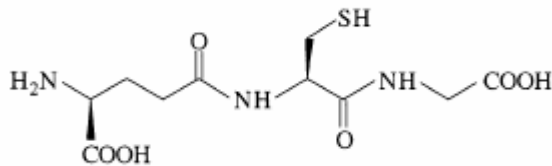
α -tokoferol (vitamin E), β -karoten, Askorbik asit (vitaminC), Folik asit (folat) [65].

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar

Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar), rekombinant süperoksit dismutaz, trolox-C (vitamin E analogu), endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px) aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein) nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin), demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin), nötrofil adezyon inhibitörleri, Sitokinler (TNF ve IL-1), Barbitüratlar, Demir şelatörleri [65].

Redükte glutatyon (GSH)

Tripeptid yapıdaki GSH (L- γ - glutamil-L-sisteinil-glisin) oksidatif ve elektrofilik stres ve radyasyona karşı hücrelerin korunmasında önemli rol oynar (Şekil 2.6). GSH sitozolik GSH redoks döngüsünde substrat olarak rol alırken, ROS'a karşı direkt olarak da savunma yapabilir.



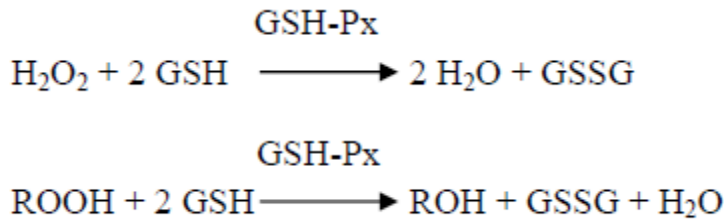
Şekil 2.6.Redükte Glutatyon (GSH)

Hücrede milimolar derişimde bulunan GSH primer olarak redükte formda (GSH) bulunur ancak okside formda disülfid dimeri (GSSG) olarakta bulunabilir [68,69].. GSH'ın hücresel seviyesi γ -glutamil transpeptidaz, aminoasit transporterları,

glutasyon sentetaz, glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktazı içeren çoklu bir enzim sistemi tarafından korunur [70].

Glutasyon peroksidaz enzimi (GSH-Px)

Glutasyon Peroksidaz organik hidroperoksitlerin (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) veya hidrojen peroksitin GSH tarafından indirgenmesi tepkimesini katalizler. 1957'de Mills tarafından keşfedilmiştir [71].

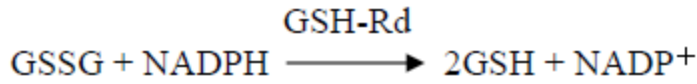


Glutasyon Peroksidaz enzimi iki gruba ayrılabilir: selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız. Selenyum bağımlı grupta hidrojen peroksit ve diğer organik peroksitleri indirgeyen beş üye vardır, selenyum bağımsız Glutasyon Peroksidaz ise hidrojenperoksit ile ihmal edilebilir bir aktifliğe sahip olup sadece organik hidroperoksitleri redükler [70].

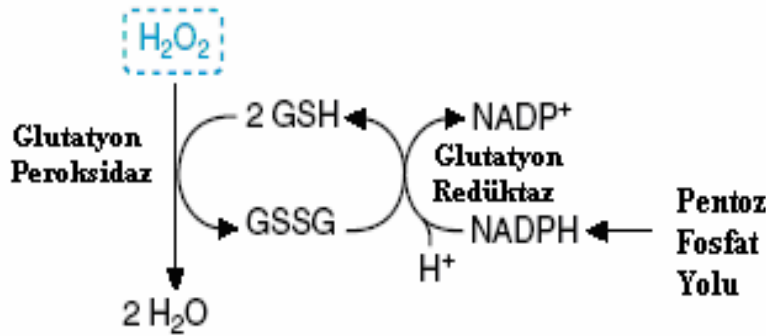
Selenyum bağımlı üyelerden, GSH-Px 1 veya hücresele GSH-Px bütün hücrelerde eksprese edilen, tetramerik yapıda, sitozolik bir enzimdir. Eritrosit, böbrek ve karaciğerde yüksek miktarda bulunur. GSH-Px 2 veya gastrointestinal GSH-Px insanlarda karaciğer ve gastrointestinal kanalda eksprese edilir; böbrek, kalp, akciğer, plasenta ve uterusda bulunmaz. GSH-Px 3 veya plazma GSH-Px plazmanın lipit kısmından izole edilmiş bir glikoproteindir, akciğer, plazma ve diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunur. GSH-Px 4 veya fosfolipit GSH-Px sitozolde, mitokondri ve hücre zarında bulunur. GSH-Px 5 veya epididimal GSH-Px selenyum bağımlı değildir ve yalnız epididimiste eksprese edilir. GSH-Px 6 hücresele GSH-Px ile homoloji gösterir, burun epiteli ve embriyolarda eksprese edilir [71-73].

Glutasyon redüktaz enzimi (GSH-Rd)

Okside glutasyon (GSSG) NADPH bağımlı flavo enzim olan Glutasyon Redüktaz tarafından redükte formuna (GSH) indirgenir [22,28,71].



Glutatyon redüktazın kalıtımı otozomal dominanttır, 8. kromozom üzerindedir. Glutatyon peroksidaz ile benzer doku dağılımı gösterir. Glutatyon redüktaz flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir, NADPH'tan bir elektronun GSSG'nin disülfüd bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu nedenle NADPH serbest radikal hasarına karşı gereklidir ve major kaynağı pentoz fosfat yoludur (Şekil 2.7) [42].



Şekil 2.7.Glutatyon redoks döngüsü

Glutatyon-S-Transferaz Enzimi (GST)

GST memeli türlerinde elektrofilik bileşenlerin GSH ile konjugasyonunu katalizleyen izoenzimlerin oluşturduğu çoklu bir gen ailesinden oluşur; alfa, mu, teta, pi,zeta, sigma, kappa ve omega olarak gösterilen 8 esas gen sınıfı ile düzenlenmiştir.Alfa kromozom 6'da, mu kromozom 1'de, teta kromozom 22'de, pi kromozom 11'de, zeta kromozom 14'de, sigma kromozom 4'de, kappa ve omega kromozom 10'da kodlanır [42,74]. GST karsinojenleri, çevresel etmenleri, ilaç ve geniş spektrumlu kasenobiotikleri metabolize eder. Mikrozomal GST belirlendiyse de GST aktivitesi esasen sitozoliktir [71]. GST iki subüniteden oluşmuş dimerik bir proteindir. Bu subünitelerden her biri glutatyon bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve

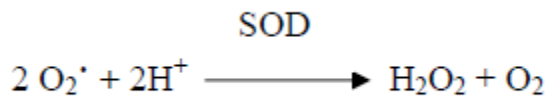
buna komşu elektrofilik substrata bağlanan nispeten hidrofobik olan başka bir bölge daha içerir. Bunun yanında çeşitli izoenzimlerde transport veya düzenleyici fonksiyonu olduğu düşünülen substrat bağlanmayan bölge de belirlenmiştir. GST, hidroksialkenler, lipid peroksidasyonunun ürünlerinden propenaller ve DNA hidroperoksitleri gibi endojen zararlı bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlayabildiği için oksidatif strese karşı savunmaya katılır, bunun yanında epoksidler ve kinonlar gibi maddelerin biotransformasyonunda elektrofilik ksenobiotikler ve/veya reaktif ara ürünler oluşabilir [42,70].

GST enziminin teta ve alfa sınıfları selenyum bağlı olmayan Glutatyon peroksidaz aktivitesi gösterir, GST pi formu lipid hidroperoksitleri ve hidroksialkenler, malondialdehitler ve propenalleri inaktive eder. GST pi ayrıca hassas SH- grubuyla ROS ile direkt reaksiyona girerek disülfüd yapımının inaktif olmasına neden olur [70].

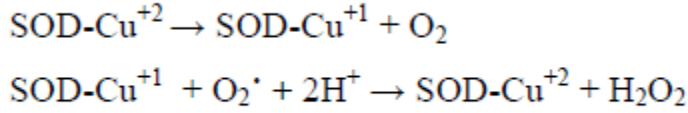
Süperoksit dismutaz enzimi (SOD)

Reaktif oksijen türlerine karşı primer antioksidan enzim SOD'dur. Formları arasında aminoasit dizilimi, aktif metal bölgesi ve hücresel dağılım farkı vardır. Prokaryotlarda Fe ve Mn-SOD bulunurken, ökaryotlarda Mn,CuZn ve ekstrasellüler SOD (EC-SOD) bulunur [75].

Mn-SOD homotetramer yapıdadır, her subünitesinde bir Mn iyonu bulunur ve 88 kDa ağırlığındadır. Hücresel Mn-SOD içeriği kalp, beyin, karaciğer, böbrek gibi yüksek metabolik aktivitesi olan dokularda daha fazladır. CuZn-SOD 32 kDa ağırlığında olup memelilerde en çok karaciğer, böbrek, eritrosit ve santral sinir sisteminde bulunur. İki protein subünitesi içerir her subünitede Cu ve Zn atomları bulunur. EC-SOD ise en çok vaskülatür, akciğer, uterus ve tiroid bezlerinde bulunur [76,77]. SOD, süperoksit molekülünün hidrojen peroksite ve moleküler oksijene tepkimesini katalizler [22,28,36].

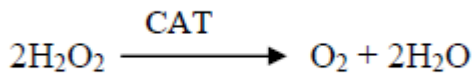


Tepkimede süperoksit anyonu Cu^{+2} ve bir arjinin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu şekilde süperoksitten bir elektron Cu^{+2} 'a transfer olurken Cu^{+1} ve moleküler oksijen oluşur. İkinci süperoksit anyonu Cu^{+1} 'dan bir elektron, bağlanma ortağından ise iki elektron alarak hidrojen peroksiti oluşturur [36,76].

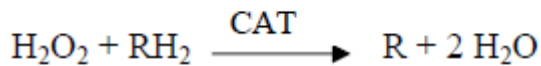


Katalaz enzimi (CAT)

CAT çoğu organizmada bulunan ve hem içeren homotetramerik bir enzimdir. Peroksizomlarda yüksek derişimlerde bulunur. Katalaz yapı ve işlevlerine göre bifonksiyoneldir. Tüm prokaryot ve ökaryotlarda bulunur. Her subünite bir hem grubu ve NADPH molekülü içerir. Birçok katalazda NADPH molekülü yüzeye yakın ve sıkıca bağlıdır. Bu kofaktör peroksitin oksijene dönüşümünde katalazın inaktivasyonunu koruduğu ve etkisini arttırdığı gözlenmiştir. Katalaz hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizler [78].



CAT ayrıca fenol, alkol gibi farklı substratların, hidrojen peroksitin çift redüksiyonu ile detoksifikasyonunu sağlar.



Glukoz-6-fosfat eksikliklerinde NADPH'ın olgun eritrostlerdeki düşüklüğünün katalazda inhibisyona neden olduğu ve hemolizin GSH-Rd/GSH-Px'den çok katalazdan kaynaklandığı düşünülmektedir [28].

Tiyoredoksin sistem

Tiyoredoksin sistem oksidoredüktaz enzim aktivitesi gösteren tiyoredoksin (Trx) ile tiyoredoksin redüktazı (TrxR) içeren iki antioksidan enzim sistemi içerir. Memeli ve prokaryotik hücrelerde bulunur. Tiyoredoksin redüktaz NADPH kullanarak

tiyoredoksinin disülfid aktif bölgesini ve pek çok substratı redükler. Yapılan çalışmalarda, tiyoredoksinin insanda immun sistem düzenlenmesiyle ilişkili olduğu ve farklı genlerce kodlanan üç farklı varyantı gösterilmiştir. Tiyoredoksin redüktaz izoenzimleri, her subünitesinde bir FAD bulunduran NADPH bağlı oksidoredüktazlardır. Tiyoredoksin redüktazın ilk saflaştırılması 1977'de yapılmıştır [28].

Ubikinon (Koenzim Q)

Ubikinon esas olarak mitokondride elektron transport zincirinin bir parçası olarak kullanılmaktadır, bunun yanında ubikinon düşük derişimlerde plazmada ve hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu antioksidan olarak bulunur. Ubikinonun yenilenmesi lipoamid dehidrogenaz ve kısmen tiyoredoksin redüktazı da içeren enzim ailesinin diğer üyeleriyle gerçekleştirilir [79,80].

Askorbik asit (C Vitamini)

Askorbik asit insan plazmasında ve hücre zarında bulunan, zarı geçebilen major antioksidanlardan biridir. Suda çözünabilir düşük moleküler ağırlıklı bu antioksidan kollojen sentezi, demir absorpsiyonu ve hücrelerin redoks durumunun korunmasında gereklidir. Tokoferoller, peroksidler ve süperoksit gibi reaktif oksijen türlerini redükler. Askorbik asitin antioksidan olarak esas görevi lipid hidroperoksitlerin oluşumunu engellemektir. Bu da aterosklerotik plak oluşumunu engellemede önemli rol üstlendiğini gösterir [81].

Karotenler (A Vitamini)

Alkoller(retinoller), aldehitler(retinaller) ve retinoik asitler başta olmak üzere A vitamininin çeşitli türleri bulunur. A vitamininin en etkili ve en yaygın türü β -karoten'dir. Suda çözünmeyen bu bileşik havada okside olarak inaktif ürünler oluşturur. A vitamininin antioksidan etkisi yanında gerekli olduğu sistemik etkiler hücre ve intrasellüler zar dayanıklılığının sağlanması, epitel dokunun bütünlüğünün sürdürülmesi ve glikoprotein sentezidir [82].

Tokoferoller (E Vitamini)

Dört farklı tokoferol formu bulunur. Bunlar α , β , γ , δ 'dir. Biyolojik olarak en yaygın ve en aktif E vitamini şekli olan d- α -tokoferoldür. Yağda çözünen fakat suda çözünmeyen bu bileşikler oksijen bulunmayan ortamlarda asit ve sıcaklığa

dayanıklıdır. Eşleşmemiş elektronlarla reaksiyona giren ve indirgeyebilen hidroksil grubu içerir. Radikal reaksiyonları sırasında zincir kırıcı etkiye sahiptir. Glutasyon ve askorbik asit ile antioksidan etkisi artar [83,84].

Flavonoidler

Flavonoidler çeşitli sebze, meyve ve otlarda bulunan polifenol grubu içeren doğal kimyasallardır. Doğada altı binin üzerinde flavonoid vardır. Antioksidan, antiarteriyosklerotik, antiinflamatuvar, antitümör, antitrombojenik, antiviral, antialerjik etkileri vardır. Flavonlar, flavonollar, flavanonlar; kateşinler, isoflavonlar, antosiyanidinler olarak altı sınıfa ayrılır. Flavonoidler, önemli metal şelatörleri ve serbest radikal temizleyicisi gibi rol oynarlar. Flavonoidler tarafından temizlenebilen ve formasyonları inhibe edilebilen reaktif oksijen ürünleri; süperoksit anyonları, hidroksil radikali, alkol radikali, peroksil radikali ve perhidroksi radikalidir. Flavonoidler, radikallerin reaktif kısımlarıyla etkileşerek, reaktif oksijen ürünlerini stabilize eder [85].

Selenyum

Selenyum yiyeceklerde selenosistein öncü maddesi olan selenitler, selenatlar ve selenometiyonin olarak bulunur. İn vitro hayvan deneylerinde Se bileşiklerinin apoptozisi ve transforme hücrelerde hücre siklusunu indirdiği gösterilmiş ve bundan dolayı da kanser hücre gelişimini durduğu ileri sürülmüştür [86].

Ürik asit

İnsanlarda pürin nükleozidleri olan adenozin ve guanozin katabolizmasının temel ürünü ürik asittir. İnsan dokularında urat oksidaz bulunmadığı için birikir. Ürik asit singlet O_2 , peroksil radikalleri, ozon ve HOCl için güçlü bir temizleyicidir ve endojen bir antioksidan olarak kabul edilir [87].

Bilirubin

Bilirubin büyük bir kısmı ömrünü dolduran eritrositlerin parçalanmasından kaynaklanır ve dolaşımdan karaciğer tarafından alınır ve biyotransformasyona uğrar, safra ve idrarla atılır. Antioksidan olarak peroksil radikalleri toplar [84].

Taurin

Organizmada sistein ve metiyoninden sentez edilen taurin protein yapısına katılmaz ve dokuda serbest olarak bulunur. Taurinin, safra asitlerinin

konjugasyonu, kolesterol atılımı, osmoregülasyon, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, hücre membranının stabilizasyonu, ve hücre içi kalsiyum seviyelerinin modülasyonu gibi önemli biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları vardır. Oksidan bir bileşik olan HOCl'i N-klorotaurine dönüştürerek hücre içinde oksidan hasar oluşmasını engeller. Bilirübin, süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısı, albümin ise LOOH ve HOCl toplayıcısıdır. Seruloplazmin olasılıkla SOD'a benzer mekanizmayla etki gösterir. Ferröz demiri (Fe^{+2}) ferrik demire (Fe^{+3}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder. Transferrin ve laktoferrin dolaşımdaki serbest demiri, ferritin ise dokudaki demiri bağlar. Sistein süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır. Ebselen selenyumlu bir bileşiktir; GSHPx aktivitesini güçlendirir ve lipoksijenaz yolunu inhibe eder. Sitokinler başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler; ancak proteolitik enzimleri aktive ettikleri için zararlı da olabilirler. Demir şelatörleri hücre içine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler, böylece Fenton reaksiyonunu ve sonuçta hidroksil radikali oluşumunu inhibe ederler. Bu özelliklerinden dolayı reperfüzyonda kullanılmalarının faydalı olduğu kaydedilmiştir. Desferroksamin serbest Fe^{3+} 'ü bağlar. Oksipürinol allopürinolün metabolitidir, doğrudan hidroksil radikali ve hipokloriti azaltıcı yönde etki eder. Mannitol hidroksil radikalini toplayıcı etki gösterir. Kan kolesterolünü düşürmede kullanılan probukol'un lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu kırıcı etkisi vardır [65].

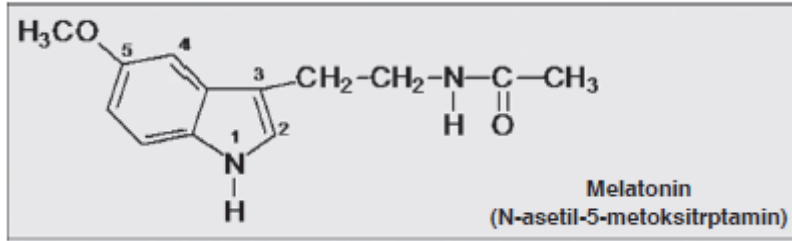
2.8. Melatonin

Melatonin'in ilk kez Lerner ve arkadaşları tarafından 1958'de pineal bezden salgılandığı keşf edilmiştir [88]. Melatoninin bu dönemde tanımı "melanophorecontracting hormon" olarak yapılmış ve gerek kurbağa derisindeki melanoforların beyaz görünüşüne neden olduğu için ve gerekse serotonininden türediği için bu isim verilmiştir [89].

Melatonin, memelilerde başlıca pineal bezden ayrıca over, lens ve kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur [90]. Retinada sentezlenen melatonin retinal pigment epitel fonksiyonunun ve fotoreseptörlerdeki gece-gündüz varyasyonuna karşı retinanın vereceği yanıtın düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Deride; pigment granüllerin

değişiminden ve derin dokuların güneşin zararlı radyasyonuna karşı korunmasından sorumlu olan melatonin, gastrointestinal kanalda enterokromofin hücrelerde sentezlenmekte ve post-prandial olarak dolaşıma katılmaktadır. Nitekim melatoninin postprandiyal plazma düzeyindeki artışlar öğün sonrası hipnotik etkisiyle ilişkisi doğrulanmaktadır. Safrada sentezlenen melatonin ise okside kolesterol türevlerine ve safra asidine karşı safra yollarının mukozasını ve epitelini oksitdatif hasara karşı kormaktadır [91].

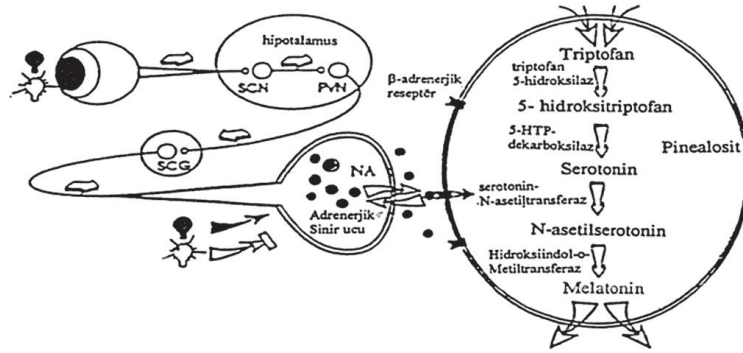
Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin, Şekil 2.8) sentezinde birinci basamak triptofanın pinealositler içine alınması ve orada pineal bir enzim olan N-asetiltransferaz (NAT) tarafından N-asetil serotonine dönüştürülmesidir.



Şekil 2.8.Melatoninin kimyasal yapısı [92].

N-asetil serotoninin melatonine dönüşümü diğer bir pineal enzim olan hidroksiindol-o-metiltransferaz (HIOMT) aracılığı ile olur (Şekil 2.9). Sentezin düzenlenmesi primer olarak geceye, diğer bir deyişle karanlığa bağlıdır. Sentezlenen melatonin pineal bezin endokrin hücreleri olan pinealositlerden hızla salgılanmaktadır. Salgılanma hızı 29 mg/gün'dür [93]. Sentezden sorumlu N-asetiltransferaz'ın aktivitesi dolayısıyla melatonin sentezi spesifik c-AMP-bağımlı transkripsiyon faktörleri ve fotoperiyodik şartlar tarafından düzenlenir. Işık altında, retinadan başlayan nöronal impulslar, hipotalamusta suprachiasmatic nükleus (SCN) ve diğer hipotalamik yapılara aktarılır. Uyarı SCN ve periventrüküler nükleus (PVN) aracılığı ile superior servikal gangliyona geçer. İnsanda karanlığın başlaması ile postganglionik sempatik liflerden salgılanan noradrenalin esas olarak β_1 reseptörlere bağlanarak, depolardaki serotonin ve NAT'nin intrasellüler salgılanmasını sağlar. Nöronlarda ve pineal bezdeki biyokimyasal sinyallerin bu döngüsü insanda melatonin anabolizmasını hızlandırır ve aynı zamanda melatoninin gün içi ritme bağlı olarak sentez ve salgılanmasını sağlar [94]. Gece saat 20.00-23.00 arası yükselen melatonin düzeyi 01.00-05.00 saatleri arası doruk

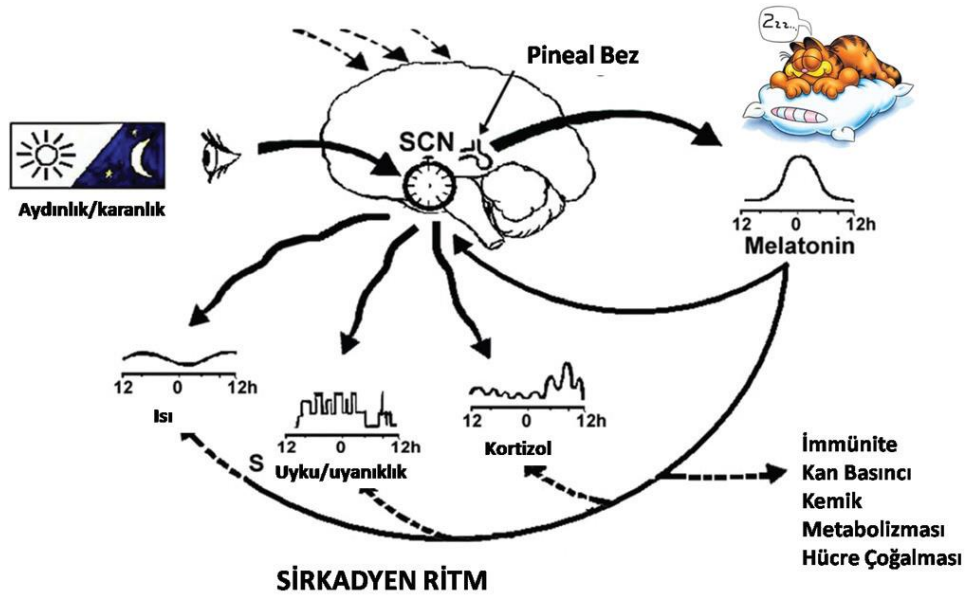
değerlere ulaşır ve gündüz düşer. Sağlıklı kişilerde plazma melatonin düzeyi gündüz 0-20 pg/ml, gece 20-200 pg/ml (ortalama 60-70 pg/ml) dir. Bir günde yaklaşık 30 mg (%80 i gece) melatonin üretilir [91].



Şekil 2.9.Karanlık/ aydınlık uyarı ile melatonin sentezinin düzenlenmesi [53].

2.8.1.Melatoninin fizyolojik etkileri- (SCN nöronları ve sirkadyen ritm üzerine etkileri)

Melatonin fotoperiyod ile ilgili bilgiyi vücudun fizyolojisine aktararak sirkadyen ritmin ve organizmanın fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar. Melatonin sekresyonunun aydınlık/karanlık siklusu ile ilişkisi bu hormonu endojen bir senkronizör olarak düşündürmektedir [95,96]. İnsanda pekçok biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal değişkenlerde olduğu gibi plazmadaki melatonin düzeyleri de 24 saatlik periyod içinde düzenli iniş çıkışlar gösterir. Bu sirkadiyen ritm hipotalamusda SCN'deki santral pacemaker'lar tarafından kontrol edilir ve ritmin başlıca ayarlayıcısı dış ortamdaki aydınlık/karanlık siklusudur (Şekil 2.10). Gece ışığa maruz kalındığında pineal fonksiyonlar akut olarak baskılanır [97].



Şekil2.10.Melatoninin ritim düzenleyici rolü [53].

Melatoninin endojen senkronizör rolünde kortizol salgılanması ile ilişkisi de önemlidir. Adrenal bezde bulunan melatonin reseptörleri fizyolojik dozlarla uyarıldığında ACTH-aracılı kortizol oluşumunu baskılar [98]. Melatonin ile kortizol ilişkisi her iki hormonunda immun sistemde etkileri yönünden önemlidir. Melatonin ve kortizol düzeyleri ters yönde hareket eder. Kortizol akşam yatma saatlerinde düşüktür, oysa melatonin kortizol tam olarak düştükten birkaç saat sonra pik yapar. Normal salgılama düzeninin bozulması sağlığın bozulması ya da kanser riski açısından bu durum önemlidir. Araştırmacılar düşük melatonin ve yüksek kortizol seviyelerinde çeşitli hastalıkların ortaya çıkabileceğini bildirmişlerdir. Yani bu iki hormon arasındaki denge sağlıklı olmak için önemlidir. Bunu belirlemede melatonin-kortizol indeksi immün fonksiyonlar hakkında bilgi verirken, ayrıca depresyon, kalp hastalığı, osteoporoz ve kilo alımı ile ilgili durumların belirlenmesinde bir marker olarak kullanılmıştır [99,100].

2.8.2.Eksojen melatonin uygulaması ile ritmin değişimi

Melatoninin Jet Lag'da kullanımı Melatonin akşama doğru veya akşam verildiğinde plazma melatoninin profilindeki değişim "phase advance" olarak tanımlanmış (24 saatlik uyku/uyanıklık siklüsünde 23.00/07.00 saatleri arası gerçekleşen uykunun, 20.00/04.00'e kayması). Buna karşılık melatonin sabah saatlerinde verilirse oluşan melatonin profil değişikliği "phase delay"dir (24 saatlik uyku/uyanıklık siklüsünde

ileri kayma olur ve 20.00/04.00 saatleri arası uykunun 23.00/07.00 e kayması) [101]. Melatoninin sirkadyen ritm düzenleyici etkisinden faydalanılarak zaman dilimini atlayan yolculuklarda kullanımı (özellikle pilot ve diğer uçak görevlilerinde) önerilmektedir. Bu amaçla; doğuya yapılan yolculukta, ön koşullama amacı ile gidilecek olan yerdeki yatma zamanına karşılık gelen saatlerde o bölgeden ayrılmadan 3 gün önce 5 mg melatonin uygulamasına başlanır, kalkış gününde aynı uygulama yapılır ve varıldıktan sonra 2 gün süreyle uygulama sürdürülür. Batıya yolculukta ise sadece uçuş sonrası önerilmektedir [102].

2.8.3.Melatonin düzeylerinin yaşa bağlı değişimi

İnsanda fetüste melatonin sentezine ilişkin bir bulgu yoktur benzer şekilde koyunlarda yapılan çalışmada da fetüste herhangi bir aktiviteye rastlanmamıştır. Melatonin anneden fetusa ve süt yoluyla yenidoğana geçebilir ve dolayısıyla fetus ve yeni doğanda sirkadyen ritm bu yolla oluşur. Melatonin konsantrasyonu yaşa bağlı değişim gösterir, yeni doğanda sekresyon çok düşüktür, doğumdan kısa bir süre sonra artarak 1-3 yaş arası pik yapar ve sonra tekrar düşer. Bundan sonra sekresyon puberte ve adolesan dönemde sirkadyen hale gelir. Yirmili yaşlardan sonra melatoninin sentez ve salgılanma hızı azalarak 60'lı yaşlarda en düşük seviyelere ulaşır [103].

2.8.4. Hormonun Farmakokinetiği

Suda kısmen ve lipidlerde yüksek oranda çözünen melatonin dolaşıma salıverildiğinde dokulara ve hücrelere kolaylıkla girebilmektedir. Jelatin kapsüller ya da tablet şeklinde oral uygulanan melatonin insanda yaklaşık 60 dakikada pik plazma düzeyine ulaşır. Bifazik eliminasyon yarılanma ömrü 3 ve 45 dakikadır. Oral uygulamada ilk geçiş etkisine maruz kalır. Melatonin esas olarak karaciğerde önce hızla 6-hidroksidopamine, sonra bir dizi reaksiyon ile N-asetil-5-metoksi-6-hidroksitriptamin'e ve daha sonra da sülfat veya glukronid ile konjuge olarak 6-sülfatoksimelatonin'e (veya 6-hidroksimelatonin sülfat) dönüşür ve idrar ile atılır. İdrarda %1 oranında değişmemiş şekli bulunmaktadır [104]. Son yıllarda tükürük melatonin düzeyi de pineal fonksiyonların bir göstergesi olarak kabul görmektedir [105].

2.8.5. Melatonin reseptörleri ve etki mekanizması

Melatonin suya göre lipid çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle hücrelere rahatça girebilmektedir. Bu nedenle etkileri sadece membrana yönelik değildir. Sulu ortamda kısmen çözünmesi de intrasellüler etkilerinin oluşmasına katkıda bulunur. Son çalışmalar melatoninin nukleusta yüksek konsantrasyonda bulunduğunu ve melatonin için spesifik bağlanma noktalarının olduğunu göstermiştir. Bu bulgulara göre melatonin etkilerinin tiroid ve steroid hormonlara benzer şekilde nukleustaki moleküler olaylarla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür. Melatonin agonisti 2-[¹²⁵I]iodomelatonin ile yapılan radyoreseptör tayinler ve in vitro kantitatif otoradyografi çalışmalarında beyinde ve insan dahil olmak üzere bazı vertebralı türlerde periferik dokularda melatonin reseptörlerinin varlığı ve bu reseptörlerin G-proteinleri ile kenetli olduğu belirtilmiştir. Melatoninin ML1 ve ML2 olarak bilinen farklı farmakolojik familyalara ait membran bağımlı iki tip reseptörü tanımlanmıştır. Güçlü melatonin agonisti 2-[¹²⁵I]iodomelatonin kullanılarak yapılan incelemelerde tavuk ve tavşan retinasında ML1 reseptörlerinin yüksek afiniteli (Kd~75pM) reseptörler olduğu, buna karşılık ML2 reseptörlerinin aynı melatonin agonistlerine düşük afinite gösterdiği belirlenmiştir [93,106]. ML1 reseptörlerinin 3 alt tipi vardır. Mel1a (Bu reseptörler MT1 reseptörleri olarak da isimlendirilmiştir; Kd; 20-40 pM), Mel1b (MT2 reseptörleri; Kd; 160 pM), Mel1c (MT3 reseptörleri; Kd;20-60 pM). ML1 reseptörleri serebellum, hipokampus dahil olmak üzere nöronal yerleşim göstermektedir. Ayrıca SCN, hipotalamus, talamus, preoptik alan, retinanın pleksiform tabakası ve serebral korteksin pek çok bölgesinde ML1 reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. Nöronal olmayan ML1 reseptörleri, serebral ve caudal arterlerde, hipofizeal pars tuberaliste, ovaryum, böbrek ve ince barsaklarda bulunmuştur. ML2 reseptörlerinin memeli hücrelerinde spesifik dağılımı henüz iyi açıklanmamıştır [91]. ML1 reseptörleri renal fonksiyon, uyku, sirkadiyen ritm, üreme ve serebral arter kontraktilesinden sorumludur. Bu reseptörler memeli retinasında Ca²⁺-bağımlı dopamin saliverilmesi ve retinal fotopigment disklerinin fagositozu gibi ışığa bağımlı olaylarda rol oynar. ML1 reseptör aktivasyonu (G proteinleri aracılığı ile) adenilat siklaz inhibisyonu ile 3'5' c-AMP düzeyinde düşmeye neden olur. Ayrıca sadece ML1 reseptörlerinin, fosfolipaz aktivasyonu aracılığı ile araşidonat saliverilmesini stimüle ettiği gösterilmiştir [107]. Düşük afiniteli ML2 reseptörlerinin de G-proteinleri ile kenetli olduğu ve sinyal iletiminde

ML1 reseptörlerine benzer davranışta bulunduğu ileri sürülmektedir. Ancak ML1'lerden farklı olarak ML2 reseptörlerinin aktivasyonunun fosfoinozitol (PI) hidrolizi ile kenetli olduğu ve selektif ML2 antagonisti uygulanımı bu hidrolizi geri çevirdiği belirtilmiştir [108]. İlginç olarak güçlü α 1-adrenerjik antagonist prazosin ML2 reseptörlerine yüksek afinite göstermekte ve melatonin ile oluşan fosfoinositol hidrolizini etkili bir şekilde azaltmaktadır. Ancak non-selektif α -adrenerjik antagonisti fentolamin ve nispeten selektif olmayan serotonin antagonisti metizerjid, melatonin ile oluşan fosfoinozitol hidrolizine etkisiz bulunmuştur. ML2 reseptörlerinin fizyolojik önemi tam olarak açıklanmamıştır [109].

2.8.6. Biyoyararlanım ve yan etki

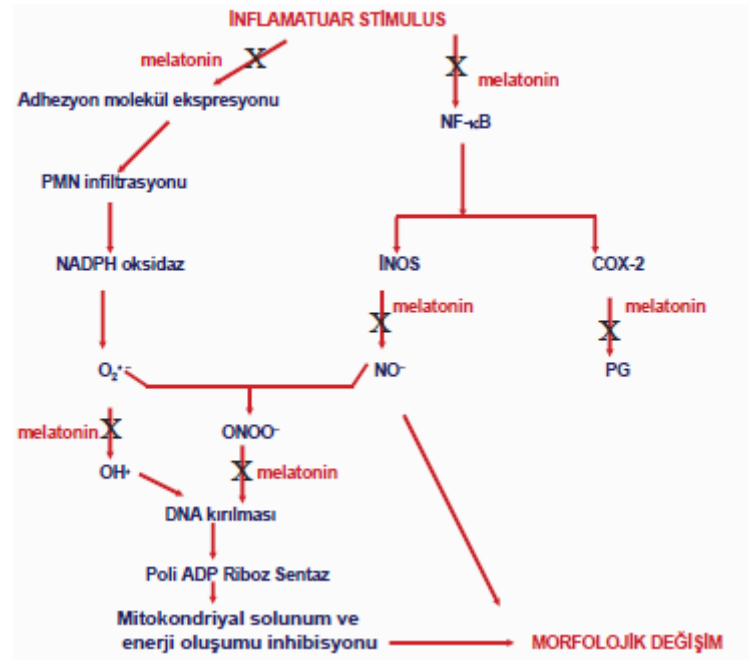
Oral uygulanan melatoninin biyoyararlanımı değişkenlik gösterir. 1-5 mg oral dozlar alındıktan 1 saat sonra serum melatoninini gece ulaşılan plasma düzeyinin 10-100 katına çıkarır ve 4-8 saat içinde düşer. Düşük dozlar (0.1-0.3 mg) gündüz alındığında gece ulaşılan melatonin pik konsantrasyonunu verebilir. Amerikada çeşitli "ilaç marketleri"nde melatoninin 0.2 mg, 0.3 mg, 0.5 mg, 1 mg, 2.5 mg, 3 mg, 5 mg'lık preparatları mevcuttur. Ayrıca likid formda (1 mg/mL, 1 mg/4 ml) preparatları da mevcut olup melatonin preparatları için herhangi ciddi bir yan etki bildirilmemiştir. Endokrin sistemdeki belirgin etkilerine rağmen yüksek farmakolojik dozlar serum LH artırabilir ve prolaktinde düşme yapabilir [110].

2.8.7. Melatonin Antioksidan Etkileri

Melatonin hidroksil ve peroksil radikallerinin güçlü bir süpürücüsüdür. OH radikalini nötralize edici etkisi glutatyondan 5 kat ve $ROO\cdot$ inaktivasyonunda ise E vitamininden 2 kat fazla etkilidir. Ancak melatoninin peroksil radikali üzerine olan etkisi tartışmalıdır. Şöyle ki bazı araştırmacılar melatoninin, peroksil radikale karşı süpürücü etkisinin E vitamininden daha düşük olduğunu dolayısı ile lipoperoksil radikale karşı daha az nötralize edici etkisinin bulunduğunu belirtmişlerdir. Bazı çalışmalarda ise melatoninin antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkisinin reseptör aracılı olmadığı ve bu etkilerin fizyolojik konsantrasyonların üzerinde olduğu bildirilmektedir [111-113]. Melatonin ayrıca inflamasyon reaksiyonları sırasında makrofajların aktivasyonu ile oluşan ve toksik bir oksijen türevi olan (HOCl)'e karşı da süpürücü etki göstermektedir. Ancak melatoninin H_2O_2 ve $O_2\cdot^-$ radikalleri üzerine direkt süpürücü etkisi zayıftır. Melatoninin H_2O_2 ile reaksiyonu sonucu N1-asetil-N2-formil-5-metoksi knüramin (AFMK) olduğu, AFMK'nın ise

katalazla N1-asetil-5-metoksi knüramine dönüştürüldüğü ve antioksidan etkiye sahip bu metabolitlerin melatoninin süpürücü etkisini artırdığı bildirilmiştir [114]. Melatoninin serbest radikaller üzerinde dolaylı etkileri de vardır. Melatonin, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive ederek, O_2^- radikalini H_2O_2 'ye kataliz eden SOD aktivitesini artırarak, oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önler. NO oluşumundan sorumlu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ederek, antioksidan etki göstermektedir [113-115].

Antioksidan savunma sistemi ile ilişkili diğer bir enzim sitokrom P450 enzimidir. Bu enzim ksenobiyotik metabolizması aracılığı ile serbest radikal oluşumunu artırır. Melatonin'in P450 aktivitesini azaltarak serbest radikal oluşumunu ve dolayısı ile oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir [113,115]. Melatonin fizyolojik konsantrasyonlarda serebellumda NOS aktivitesini baskılayarak nöral ve kardiyovasküler fonksiyonların fizyolojik düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu şekilde melatoninin serbest radikal oluşumunu önleyici olarak etki etmektedir. NO tek başına bir serbest radikaldır ve O_2^- varlığında $ONOO^-$ oluşumunu artırır. Melatonin ile NOS aktivitesinin baskılanması NO oluşumunu azaltarak bu yolak üzerinden oksidatif hasarı azaltmaktadır [116,117]. Melatoninin serbest radikaller üzerindeki süpürücü etkisi onun aynı zamanda güçlü bir antiinflamatuvar ajan olduğunu da açıklamaktadır. İnflamasyonun uyarılmasıyla doku hasarına giden yolak üzerinde çeşitli kademelerde melatonin ile blokaj bu ajana antiinflamatuvar ve doku koruyucu etki sağlamaktadır. Şekil 2.11'de inflamasyonun indüklediği adhezyon molekül ekspresyonu, NF-kB, iNOS, PG, süperoksid ve peroksi nitrit radikallerinin doku hasarındaki rolü ve melatoninin bu etkenlerin oluşumlarının baskılanması ile antiinflamatuvar etkisi özetlenmiştir. Çeşitli inflamasyon modellerinde (yanık hasarı, sepsis, iskemi/reperfüzyon gibi) nötrofil aktivasyonunun dokularda neden olduğu oksidan hasarları melatonin anlamlı olarak geri çevirmiştir [118-122].



Şekil 2.11.Doku hasarına yol açan inflamatuvar yolda melatoninin etkileri [123].

2.8.8. Melatoninin İmmünolojik Etkileri

İlk defa Maestroni ve arkadaşları melatoninin immünolojik rolünü göstermiştir. Farelerin devamlı ışığa maruz kalması veya gece β -adrenerjik reseptör blokörlerinin uygulanımı gibi melatonin oluşumunun inhibe edildiği şartlarda immün fonksiyonların baskılandığı görülmüştür. Sonraki çalışmalardan alınan sonuçlar melatoninin humoral ve hücrel immün yanıtı artırdığını desteklemiştir. Melatoninin bu etkisi normal şartlarda belirgin değildir. Yaşlanma, viral hastalıklar, kortikosteroid kullanımı veya akut stress gibi immün sistemin baskılandığı durumlarda etki belirgin hale gelmektedir [124-126].

2.8.9. Melatonin'in bazı ilaç toksisitesini azaltıcı ve etkinliğini artırıcı etkileri

Melatonin birçok ilacın neden olduğu çeşitli dokularda oksidan hasarla karakterize yan etkilere karşı koruyucu etkisinin gösterilmesi, bu ilaçların kullanımını sınırlayıcı yan etkileri azaltılarak, tedavinin etkinliğini artırması ve özellikle kanser hastalarının yaşam kalitesinde olumlu etkisi ile önem kazanmaktadır. Söz konusu ilaçlar arasında doksorubisin, sisplatin, bleomisin, gentamisin, indometasin, izoniyazid, fenobarbital, karbamazepin, haloperidol, siklofosamid, asetaminofendemir ve eritropoietin sayılmaktadır [92].

2.8.10. Kardiyovasküler sistem

Son yıllarda elde edilen bulgular melatoninin kalp-damar sistemine etkilerinin reseptör ve non-reseptör aracılı olduğunu göstermiştir. Melatonin serebral arterlerde vazokonstrüksiyona ve periferdeki damar yataklarında ise vazodilatasyona neden olmaktadır. Myokard infarktüs riski ve ani ölüm riski olan koroner kalp hastalarında melatonin düzeyleri düşük bulunmuştur [127,128]. Benzer şekilde LDL-kolesterol düzeyleri yüksek olanlarda ve ayrıca hipertansif hastalarda melatonin düzeyi düşüktür ve melatonin uygulamasının kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir [129].

2.8.11. Kemik koruyucu etki

Melatoninin kemik üzerine etkisi direktir. Melatonin sekresyonunun baskılanması serumdaki kalsiyum konsantrasyonunu düşürürken, melatonin uygulaması ise artırır [130]. Melatonin kemik iliğinde bol miktarda bulunması melatonin kemik hücrelerindeki etkilerinin muhtemelen otokoid etkiler aracılığı ile olduğunu düşündürmektedir. Melatonin ayrıca doz bağımlı olarak kemik matrix proteinlerindeki artırır. Osteoblastik bir protein olan osteoprotegerin melatonin ile artmıştır [131]. Günümüzde yaygın olarak postmenapozal dönemde osteoporoza karşı kullanılan bifosfonatlara ilave olarak melatonin uygulamasının gerek direkt kemik üzerine olumlu etkileri ve gerekse bu ilaçlara bağlı yan etkileri azaltarak kemik koruyucu etkiyi güçlendirebileceği düşünülmektedir [132].

2.8.12. Melatoninin Merkezi Sinir Sistemi üzerine etkileri

Günümüzde serbest radikallerin yaşlanma ile ilişkisi olduğu bilinmektedir. Beyin dokusunun oksidatif hasara oldukça duyarlı olması, yaşlanma ile birlikte makromoleküllerde oksidatif hasar birikimi ve inflamasyon gelişimi melatonin tedavisinin yaşa bağlı merkezi sinir sistemi fonksiyonlarındaki değişime karşı koruyucu olabileceğini düşündürmüştür. Yaşlı hayvanlarda yapılan çalışmada melatonin in nörogenezi artırdığı belirlenmiştir [133].

2.8.13. Melatonin ve uyku

Uyku üzerine etkilerinin muhtemelen kronobiyotik etkiler olduğu ve ayrıca melatoninin damarlarda vazodilatör etkiye bağlı olarak core temperaturu düşürerek uykuyu indüklediği, uykuya dalış süresini kısalttığı ve uyku kalitesini arttırdığı bilinmektedir [92].

Melatoninin yukarıda bahsedilen etkileri dışında migren, reproduktif sistem, tümör hücrelerinde direkt onkostatik ile antikanser ve apopitotik etkisinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [134-136].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı İlaç Araştırmaları Yerel Etik Kurulunun 13/133 nolu karar ile onay alındıktan sonra başlatılmış ve çalışma süresince yapılan tüm işlemler etik kurul yönergesinde belirtilen kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen Wistar albino türü dişi sıçanlar kullanıldı. Kafesler içinde tutulan sıçanlara günün normal düzeninde 21°C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında su ve besin ihtiyaçları sağlandı. Çalışmanın iskemi reperfüzyon aşaması DEKAM'da, histopatolojik kısmı Erciyes Üniversitesi Patoloji AD ve Histoloji-Embriyoloji AD, biyokimyasal aşaması ise Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya EREN Genom ve Kök Hücre Merkezin'de yapılmıştır.

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.2. Kullanılan aletler

Hassas terazi (Schimadzu, Libror, AEG 220)

Homojenizatör (Heidolph DIAX 900)

Vorteks (Heidolph Reax 2000)

Benmari (Heto)

Santrifüj (Hermle Z 380K)

Soğutmalı santrifüj (Damon IEC, B-20A soğutmalı, Hermle Z 323K)

pH metre (Jenway)

Spektrofotometre (Schimadzu, UV1601)

3.1.3. Kullanılan kimyasallar

Melatonin, potasyum fosfat (KPO_4), dH_2O , Comassie Brilliant Blue G 250 (Amresco), etanol, orto-fosforik asit, serum albümini (BSA) fraksiyon V (Sigma), 1X Bradford ayırıcı, sodyum dodesil sülfat (SDS), asetik asit (HAc), tiyobarbitürik asit (TBA), n-Butanol-piridin (nBu-Pri) çözeltisi, 1,1,3,3 tetrametoksipropan, ksantin, nitroblue tetrazolium (NBT), sodyum karbonat (Na_2CO_3), bakır klorür ($CuCl_2$), ksantin oksidaz (XO), amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$) ve kloroform kullanılmıştır.

3.2. Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Deney hayvanlarının hazırlanması

Çalışmada kullanılacak sıçanlar rastgele seçilerek her grupta 7 rat olacak şekilde kontrol (1), I/R (2), melatonin (3) ve melatonin+I/R ve 3 deneysel olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

Deney sonucunda sıçanlar anestezi altında sakrifiye edilerek böbrek dokuları çıkarıldı. Soğuk serum fizyolojikle yıkandıktan sonra bir kısmı histopatolojik inceleme için %10'luk formalin ile tespit edilerek parafine gömüldü. Parafin bloklara gömülen dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksil-eozin (HE) boyası ve TUNEL ile boyandı.

Böbrek dokusunun diğer parçası ise spanca sarılarak deney aşamasına kadar -80°C'de muhafaza edildi (Resim 3.1).



Resim 3.1.A-Ratın sakrifiye edilmesi, B-Böbreğin karın içerisinden çıkarılması,C-Böbreğin kesilerek formaline konulması ve -80°C'ye kaldırılması

Melatoninin hazırlanışı

Bir hayvan için, 25 mg melatonin hassas terazide tartılarak 1 ml'lik etanol içerisinde çözüldükten sonra üzerine serum fizyolojik eklendi. Karışım vorteksenerek melatonin hazır hale getirildi. İnsülin enjektörüyle 2 ml çekilerek sıçanlara intraperitoneal (i.p) enjeksiyon yapıldı.

3.2.2. İskemi reperfüzyon tekniği

Çalışmamızda ağırlıkları 200-250 gram, 28 adet dişi Wistar Albino türü sıçan kullanıldı. Sıçanların, 80 mg/kg dozda ketamine hydrochloride (Ketalar, Pfizer, Groton, CT) ve 10 mg/kg xylazine hydrochloride (Rompun; Bayer, Leverkusen, Germany) kombine intraperitoneal enjeksiyonu ile derin anestezisi sağlandı. Sıçanın sol tarafında son kaburganın altından başlayarak aşağıya doğru

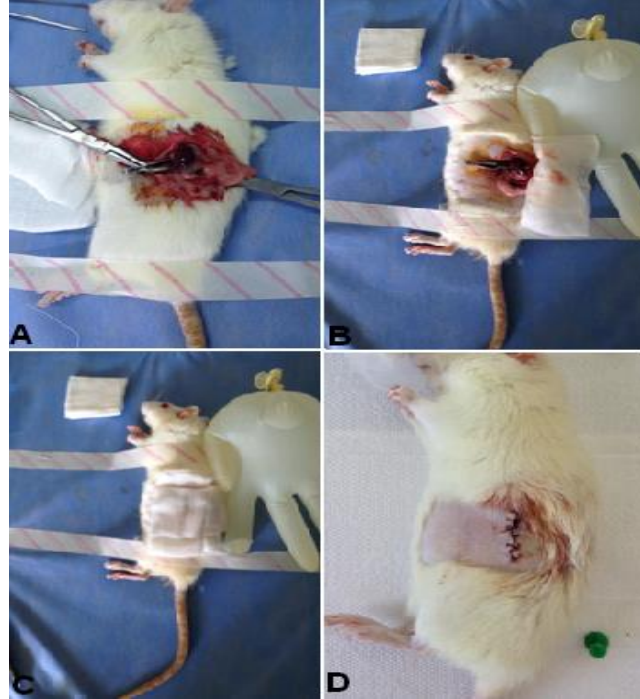
tıraşlanarak deri görünür hale getirildi. Sıçan düz bir satıha sağ tarafı üzerine yatırılarak sabitlendi. Sıçanın sol tarafında son kaburganın altında parmakla palpe ederek böbreğin yeri tespit edildikten sonra tıraşlanan bölgeye steril spançla batikon sürüldü. Steril bisturi ve pens yardımıyla yukarıdan aşağıya doğru 2-3 cm'lik bir insizyon açıldı (Resim 3.2). Bisturi ucuyla karın boşluğuna girilerek makas yardımıyla insizyon alanı böbreğin çıkabileceği boyuta getirildi. Pens yardımıyla yağ dokusu ile beraber böbrek de dışarı çıkartıldı.



Resim 3.2.Sıçana insizyonun uygulanışı

Daha sonra böbreğin üzerindeki yağ dokusu temizlenerek renal damar görünür duruma getirildi. Böbreğe zarar vermeden damara 38 mm'lik bulldog damar klempı yerleştirilerek 45 dakikalık iskemi başlatıldı. Operasyon bölgesinin üzerine steril spanç yerleştirildi. İskemi boyunca sıçanın iç organlarının su kaybetmemesi yani kurumaması için spanç 3-5 dk aralıklarla vücut sıcaklığındaki steril serum fizyolojikle ıslatıldı. Derin anestezi boyunca vücut ısısının düşmemesi için hayvanın karın ve sırt bölgesine sıcak su balonları kondu. Operasyon sırasında anesteziden çıkma belirtileri (göz kapağı refleksinin hızlanması kas uyarısının artması vb) gösteren hayvanlara 40 mg/kg dozda ketamine i.p verilerek anestezinin devamı sağlandı. İskemi süresi tamamlandıktan sonra damar klempı çıkartıldı. Reperfüzyonu başladıktan sonra yağ dokusu ile birlikte böbrek karın boşluğu içerisine yerleştirildi. İnsizyon dikilmeye başlanmadan önce, karın içi organların anatomik konumlarına

yerleşmelerini kolaylaştırmak amacıyla karın boşluğuna vücut sıcaklığına getirilmiş 1-2 ml steril serum fizyolojik döküldü. Deri altı bağ dokusunun ve kas tabakasının dikilmek suretiyle kapatılması için atravmatik iğneli 6-0 nolu Vicryl (emilebilir) kullanıldı. Deri altı bağ dokusu ve kas dokusu basit sürekli dikişlerle kapatıldı. Deri dikişleri için travmatik iğneli 4-0 nolu Vicryl kullanılarak basit ayrı dikişlerle deri kapatıldı. Sızıntı kanaması olup olmadığı kontrol edilip kanama olmadığı belirlendikten sonra dikiş hattı batikonla silindi (Resim 3.3).



Resim 3.3.A-Böbreğin karın boşluğundan çıkarılışı, B-Renal damara buldogun yerleştirilmesi,C-İskeminin başlaması,D-Reperfüzyon başladıktan sonra sıçanın dikilmesi

I. Grup (n=7) (Kontrol):Hayvanlara herhangi bir ilaç enjeksiyonu ya da iskemi reperfüzyon işlemi yapılmadı.

II.Grup (n=7) (I/R): Herhangi bir ilaç enjeksiyonu yapılmadan sol renal arter 45 dakika iskemiye sokuldu ve iskemiden çıkarılıp reperfüzyonundan emin olduktan sonra kapatılarak, 24 saat yaşamalarına izin verildi.

III.Grup (n=7) (Melatonin grubu): Hayvanlara, 25 mg/kg dozunda melatonin i.p olarak enjekte edildi ve iskemi reperfüzyon işlemi uygulanmadı.

IV.Grup (n=7) (Melatonin+I/R grubu): Gruptaki tüm hayvanlara 25 mg/kg dozunda melatonin i.p olarak enjekte edildi ve enjeksiyondan bir saat sonra hayvanlar 45

dakika iskemiye sokuldu, iskemiden sonra reperfüzyonunda 24 saat yaşamasına izin verildi.

3.3. Yöntemlerin Uygulanması

3.3.1. Böbrek doku hücrelerinin homojenize edilmesi

Böbrek doku örnekleri enzim aktivitesi çalışılacağı zaman -80°C 'den çıkartıldı. 500 mg doku 1/10 oranında (w/v) serum fizyolojik ile cam-cam homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Homojenat soğutmalı santrifüjde 12.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Supernatantların bir kısmı MDA analizi, katalaz enzim aktivitesi ve protein tayini için ayrıldı. Kalan supernatantlar 5/3 (v/v) etanol/kloroform karışımı ile 1/1 oranında karıştırıldı. Soğutmalı santrifüjde 12.000 rpm'de 20 dakika tekrar santrifüj edildi. Üst tabaka SOD ve GST enzim aktivitesi için ayrıldı.

3.3.2. Sıçan böbrek doku örneklerinde protein tayini

Homojenat ve supernatantlardaki protein miktarı Lowry metoduna göre yapıldı [137]. Protein standartı olarak BSA (Sigma) kullanıldı. 0.02- 0.25 mg/ml konsantrasyon aralığında standartlar kullanılarak standart grafik çizildi ve eğimden numunelerdeki protein miktarı mg/mL olarak hesaplandı.

Metodun Prensibi: Alkali ortamda proteinler Cu^{2+} ile Cu^{++} -peptid (protein) kompleksi oluşturarak fosfo molibdat-fosfo tungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifini) redükleyerek mavi-mor renkli ürün oluşturması esasına dayanmaktadır. Rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şu önemli noktaya dikkat edilmesi metodun iyi işlemesi açısından önemlidir. Reaktif yalnız asidik ortamda dayanıklı olmasına rağmen metod gereği redüklenme olayı alkali ortamda ($\text{pH}=10$) gerçekleşmektedir. Bu yüzden folin reaktifi alkali bakır-protein kompleksine ilave edildikten hemen sonra iyice karıştırılmalıdır. Böylelikle folin reaktifi bozulmadan önce redüklenme gerçekleşir (Şekil 3.1).

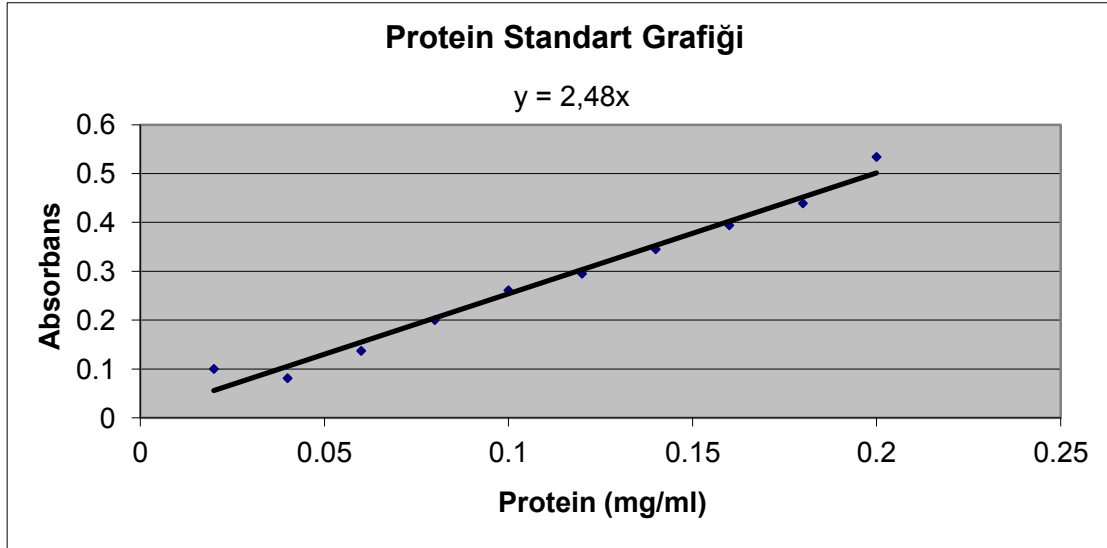
Reaktifler:

A reaktifi: 0.5g. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 1.0g. Na_3 -Sitrat bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra 100 ml'ye tamamlanır.

B reaktifi: 20g.Na₂CO₃ ve 4.0g.NaOH bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra litreye tamamlanır.

C reaktifi: 50ml B çözeltisi + 1.0ml A çözeltisi karışımı.

D reaktifi (Folin-Ciocalteu Çözeltisi):önceden hazırlanan reaktif deiyonize suyla eşit oranda dilue edilerek kullanılır.

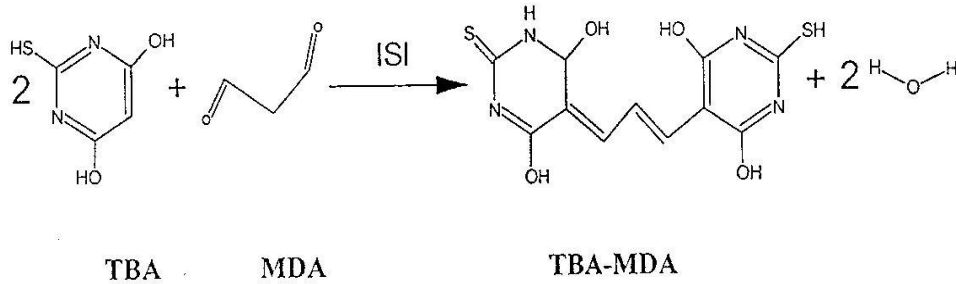


Şekil 3.1. Protein standart eğrisi

3.3.3. Sıçan böbrek doku örneklerinde Malondialdehit (MDA) tayini

Malondialdehit tayini Van Ye TM ve arkadaşlarının tarif ettiği metoda göre çalışıldı [138].

Metodun prensibi: İki mol TBA asidik ortamda ve 85-100 °C sıcaklıkta bir mol MDA ile birleşerek mor renkli TBA-MDA kompleksini oluşturur. Bu kompleksin verdiği absorbans 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür (Şekil 3.2).



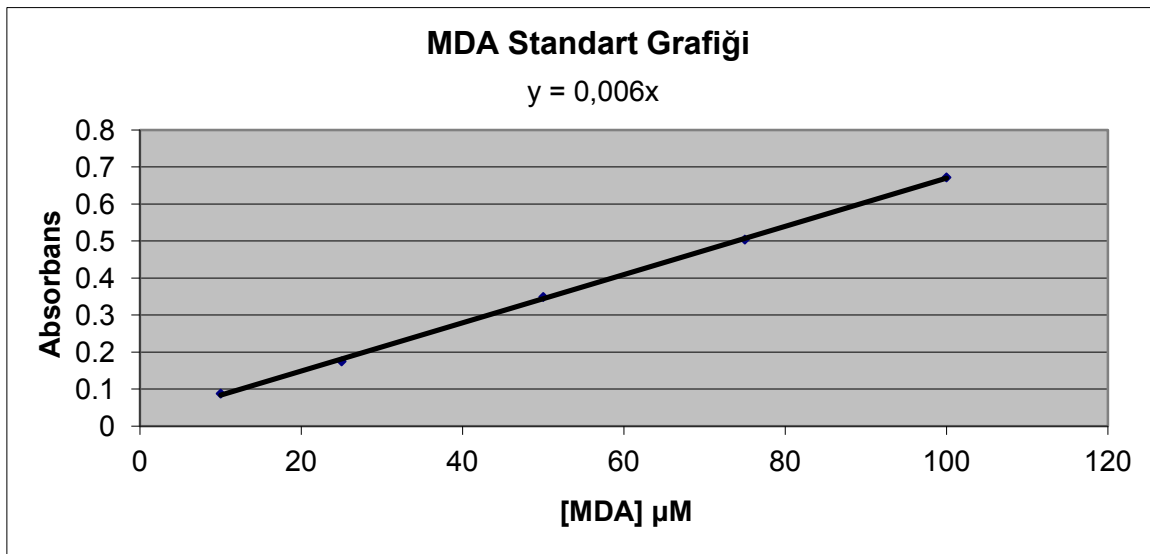
Şekil 3.2.TBA-MDA kompleksi oluşumu.

Reaktifler

1. Fosfat Tamponu: 100 mM, pH:6 izotonik $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$
2. % 20'lik TCA çözeltisi
3. % 1'lik TBA çözeltisi
4. MDA standardı: 1,1,3,3-Tetraetoksi propan standart çözelti olarak kullanıldı. 1,1,3,3-Tetraetoksi propandan önce 10 mM'lık stok çözelti hazırlandı, stok çözeltiden uygun seyreltmelerle 10, 25, 50, 75 ve 100 μM 'lık standart çözeltiler hazırlanarak standart grafik çizildi. Absorbans = f(Konsantrasyon) grafiğinin eğiminden numunelerdeki MDA miktarları μM olarak hesaplandı.

Deneyin Yapılışı:

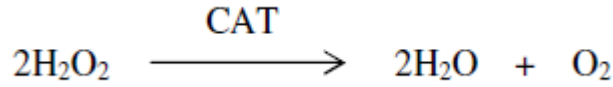
Doku örneklerinde MDA miktarları ölçümü için daha önce hazırlanan ham homojenat 5000xg de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar alındı. Her bir örnek numune için kör çalışıldı. Numune tüplerine tampon çözelti, etanol, TBA, TCA ve numune eklenirken, kör tüplerine TBA hariç diğerleri eklenerek hazırlandı. 60 dakika kaynar su banyosunda (85-100 °C) bekletildikten sonra çeşme suyu altında soğutuldu, 5000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatantları ayrıldı. Daha sonra kör tüplerine TBA eklendi iyice karıştırıldı ve 532 nm.'de her bir tüpün absorbansı distile suya karşı okundu (Şekil 3.3).



Şekil 3.3.MDA standart eğrisi

3.3.4. Sıçan böbrek doku örneklerinde Katalaz (CAT) aktivitesinin ölçümü

Metodun prensibi: CAT katalitik aktivitesiyle H_2O_2 , bozunarak su ve oksijene yıkılmaktadır.



H_2O_2 ultraviyole spektrumunda absorpsiyon veren bir maddedir. Maksimum absorban 240 nm'de meydana gelmektedir. Deney ortamına ilave edilen H_2O_2 'nin CAT tarafından su ve oksijene parçalanması 240 nm'de absorban azalması ile kendini gösterir (ϵ : $0.04098 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Absorbansta gözlenen bu azalma ortamdaki CAT enzim aktivitesi ile doğru orantılı bir eğilim göstermektedir [139].

Kullanılan reaktifler

- 1.Fosfat tamponu (50 mM, pH=7.0)
- 2.Tamponlanmış H_2O_2 çözeltisi

Çözeltilerin hazırlanışı

Fosfat tamponu (50 mM, pH=7.0): a) 6.81 g KH_2PO_4 ve b) 8.90 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ tartılıp ayrı ayrı distile suda çözüldükten sonra hacimleri ayrı ayrı distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Kullanılacağı vakit a'dan 1 hacim b'den 1.5 hacim alınarak karıştırıldı (pH=7.0 olmalı) ($2^\circ C$ de saklanır) (fosfat tamponu bakteriyel kontaminasyon olmadığı sürece stabildir, kullanılabilir).

H_2O_2 çözeltisi (30 mM) + Fosfat tamponu: Yoğunluğu $d=1.11 \text{ g/ml}$ olan % 30 g'lık H_2O_2 çözeltisinden 0.31 ml alınır ve 50 mM'lık fosfat tamponu (pH=7.0) ile 100 ml'ye seyreltilir (taze hazırlanır).

Deneyin yapılışı

Numune ve kör olarak işaretlenmiş 2 ayrı deney tüpüne alındı. Numune tüpünde doku süpernatantı tamponlanmış H_2O_2 çözeltisi ilave edilerek daha önce 240 nm'de $A=0$ ayarı yapıp saniyede 0.,1.,2. ve 3. Dk'da absorban okundu.

Kör tüpünde fosfat tamponu ve doku süpernatantı ilave edilerek karıştırıldı. 30 saniye sonra 240 nm'de absorbanları okunarak kaydedildi. Kör tüpü H_2O_2 içermemektedir.

Sonuçlar bu deney için ekstinksiyon katsayısı 0.004 (0.00394) $\text{mM}^{-1}/\text{mm}^{-1}$ 'dir. CAT aktivitesi doku için IU/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.3.5. Sıçan böbrek doku örneklerinde Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü

Durak İ ve ark. tarafından tanımlanan yöntem kullanıldı [140].

Metodun prensibi: Bu yöntem, ksantin/ksantin oksidaz enzimatik reaksiyonu ile oluşan süperoksit radikallerinin ortamda bulunan (nitroblue tetrazolium) NBT'yi indirgemesi esasına dayanır. Renksiz NBT iyonu, süperoksit radikali ile indirgendiğinde 560 nm 'de maksimum absorbans veren mavi renkli formazona dönüşür.

Kullanılan reaktifler

- 1.Stok ksantin: 3 mmol/L
- 2.NBT: $150\text{ }\mu\text{mol/L}$
3. Na_2CO_3 : 400 mmol/L
- 4.BSA: 1 g/L
5. CuCl_2 : 0.8 mmol/L
- 6.XO enzim çözeltisi: $1/100$ (v/v) 2 M 'lık amonyum sülfat çözeltisi ile dilüe edildi.
- 7.Kloroform/etanol: $3/5$ (v/v)

Reaktif karışımı

40 ml 10 kat dilüe edilmiş stok ksantin çözeltisi
 + 20 ml NBT
 +12 ml Na_2CO_3
 + 6 ml BSA karıştırıldı. 250 ml'ye tamamlandı.

Deneyin yapılışı

2.9 ml reaktif karışımına $50\text{ }\mu\text{l}$ süpernatant ve $50\text{ }\mu\text{l}$ XO çözeltisi eklendi. 25°C 'de 20 dakika inkübasyondan sonra tüplere $0,8\text{ mM}$ CuCl_2 'den 1 ml eklendi ve 560 nm 'de örneklerin absorbansları okundu.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(\text{Kör abs} - \text{Numune abs})}{\text{Kör abs}} \times 100$$

% 50 inhibisyonu 1Ü aktivite kabul edilerek hesap yapıldı. SOD enzim aktivitesi ölçümünde, elde edilen sonuçlar Ü/mg protein şeklinde ifade edildi.

3.3.6. Sıçan böbrek doku örneklerinde Glutatyon-S-Transferaz (GST) aktivitesinin ölçümü

Metodun prensibi: 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)+ GSH→S-2,4-dinitrophenylglutathione (DNPG)+H⁺ +Cl⁻ Reaksiyonu gereği oluşan DNPG'nin 340 nm'de maksimum absorbands vermesi esasına dayanır (DNPG ε: 10 M⁻¹.cm⁻¹) [141].

Çizelge 3.1. GST ölçüm tablosu

Reaktif (mL)	KÖR	NUMUNE
Fosfat Tamp.	1.6	1.5
CDNB	0.2	0.2
37°C de 10 dakika inkübasyon		
GSH	0.2	0.2
Serum/Homojenat	*****	0.1

Çizelge 3.1'de görüldüğü gibi her bir numune ve kör için gerekli çözeltiler eklenip karıştırıldıktan sonra, 340 nm de d.suya karşı absorbands'ın sıfır ayarı yapılır. Daha sonra kör'ün absorbandsı okunarak, numunelerin absorbandsları 0., 1., 2., 3., 4. ve 5. dakikalarda okunur, hesaplamada lineer bölge dikkate alınır ve absorbands farklarından 1 dakikadaki absorbands değişimi (ΔAbs/dak) bulunur.

Kullanılan reaktifler

1. Tampon çözelti: 100 mM, pH: 6.5 Na₂HPO₄/KH₂PO₄ (sırası ile 2.13 gr. Na₂HPO₄ ve 11.56 gr KH₂PO₄ tartılıp 1L lik çözelti hazırlanır.)
2. CDNB(1-Kloro2,4-Dinitrobenzen): 25 mM, absolu etanolde çözünür (Mw: 202.6 g/mol). 506.5 mg/ 100 mL saf etanol (Final konsantrasyon:2.5.mM)
3. GSH: 50 mM (Tamponda çözülür, 307.3 g/mol). 1.5365 g/100 mL tampon (final kons. 5 mM)

Aktivite (IU/mL): ΔAbs. Ve DNP'nin ε değerinden yararlanılarak hesaplandı (ε:10 M⁻¹.Cu⁻¹ DNPG için)

Spesifik aktivite ise: IU/mg protein olarak verildi.

3.4. Histopatolojik İnceleme

Sıçanlardan elde edilen böbrek dokuları serum fizyolojikle yıkandıktan sonra %10'luk formalinde tespit edildi. Daha sonra rutin histolojik doku takip yöntemlerin geçirilerek parafin bloklara gömüldü.

3.4.1. Hematoksilen-Eozin ve PAS boyama yöntemi

Sakrifiye edilen sıçanlardan alınan böbrek dokuları %10'luk formalin içerisine kondu. Böbreğin fiksasyonu sonrası rutin histolojik takip aşamalarından geçirildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Böbrek dokularının bulunduğu parafin bloklardan alınan 5 µm'lık kesitler poli-lizinle kaplı lamlara alındı. Elde edilen ve deney gruplarına ait olan böbrek dokularına hematoksilen-eozin boyamaya ek olarak böbrek dokularında bazal membran yapılarının ve tübüllerin daha net görülebilmesi için periyodik asit schiff (PAS) boyama metotları uygulandı.

H&E ve PAS ile boyanan preparatların histolojik değerlendirmesi için DP 70 dijital kamera ile donatılmış Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya) kullanıldı. Hazırlanan preparatlardan kontrol ve deney gruplarına ait böbrek dokularının parankima yapıları incelenerek görüntüler elde edildi ve histopatolojik olarak değerlendirildi.

3.4.2. TUNEL boyama

Kontrol ve deney gruplarına ait böbrek kesitlerinde apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarının in situ saptanmasında en duyarlı ve en hızlı metot olarak TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick end Labeling) işaretleme yöntemi kullanılmıştır. Özetle, poli-Llizinle kaplı lamlara alınan 5µm'lık kesitler ksilende deparafinize edildi, azalan alkol serilerinden geçirildi ve oda sıcaklığında PBS (phosphate buffer saline)'de 5 dk inkübe edildi. 15 dk proteinaz K ile inkübe edilen kesitler distile su ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini bastırmak için %30'luk H₂O₂ ile muamele edildi. Sonraki basamaklar için kitte (Apoptaq In Situ Cell Death Detection Kit, Millipore, S7110) bulunan ve üretici firma tarafından önerilen boyama metoduna uygun olarak immunofluoresan boyama yapıldı. Bunun için, PBS ile yıkanan kesitler TdT enzimi ile 37°C'de karanlık ve nemli ortamda 60 dakikada inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkanan kesitler oda sıcaklığında anti-digoxigenin conjugate ile tepkimeye girdi. Bütün inkübasyon basamakları nemli ortamda yerine getirildi. Görüntü elde etmek için slaytlar immunofluoresan mikroskobunda (Olympus BX 51) incelendi.

Gruplardaki TUNEL+ hücre sayılarını karşılaştırmak için, ışık mikroskobu altında aynı büyütmede olacak şekilde (X400) her kesitten rastgele 10 farklı alan seçildi. Korteks ve medulla ayrımı yapılmaksızın seçilen bu alanlarda yeşil yansımalar ile ayırt edilen TUNEL+ hücreler Image J software programı kullanılarak dikkatli bir şekilde sayıldı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

3.5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS Statistcs 21 istatistik paket programında değerlendirildi. Biyokimyasal değişkenler tek yönlü variance analizi (ANOVA) ile çoklu karşılaştırma analizine ise Student-Newman-Keuls testi ile bakıldı. Histopatolojik verilerin normal dağılımına Shapiro-Wilk testi uygulandı. Apoptoz değişkenlerine Kruskal-Wallis analiziyle, çoklu karşılaştırma analizine ise Dunn testiyle bakıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD (standart deviasyon) olarak verildi ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal ve Histopatolojik Bulgular

Rat böbrek dokularına ait enzim aktivite sonuçları gruplara göre Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1-4.5 de görülmektedir. Histolojik bulgular ise Resim 1-14 de görülmektedir.

Çizelge 4.1.Rat böbrek dokularına ait Ortalama $\pm$ Standart sapma olarak SOD, CAT ve GST enzim aktivite değerleri ile MDA miktarı.

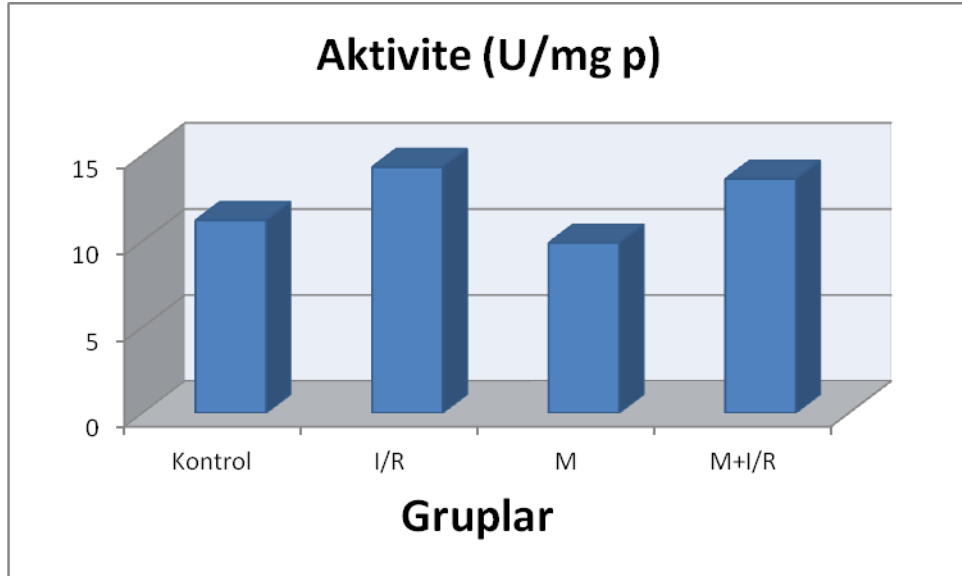
Gruplar	SOD (U/mg p)	CAT (IU/mg p)	GST (IU/mg p)	MDA (μ mol/mg p)
Kontrol (K)	11.2 $\pm$ 0.36	20.4 $\pm$ 6.33	2.16 $\pm$ 0.41	3.1 $\pm$ 0.12
İskemi/reperfüzyon (I/R)	14.3 $\pm$ 0.99 $\uparrow$	23.8 $\pm$ 10.57 $\uparrow$	4.23 $\pm$ 0.98 $\uparrow$	4.5 $\pm$ 0.23 $\uparrow$
Melatonin (M)	9.89 $\pm$ 0.29 $\downarrow$	19.9 $\pm$ 3.61 $\downarrow$	1.48 $\pm$ 0.43 $\downarrow$	2.1 $\pm$ 0.03 $\downarrow$
Melatonin+I/R (M+I/R)	13.6 $\pm$ 0.36 $\uparrow$	24.3 $\pm$ 11.31 $\uparrow$	3.37 $\pm$ 0.36 $\uparrow$	1,9 $\pm$ 0.25 $\downarrow$
İstatistiksel değerlendirme (ANOVA ve Student-Newman-Keuls testi)				
Gruplar	SOD	CAT	GST	MDA
K-I/R	P<0.05 $\uparrow$	p>0.05	P<0.05 $\uparrow$	p>0.05
K-M	P<0.05 $\downarrow$	p>0.05	P<0.05 $\downarrow$	P<0.05 $\downarrow$
K-(M+I/R)	p>0.05	P<0.05 $\uparrow$	P<0.05 $\uparrow$	P<0.05 $\downarrow$
I/R-M	P<0.05 $\downarrow$	P<0.05 $\downarrow$	P<0.05 $\downarrow$	P<0.05 $\downarrow$
I/R-(M+I/R)	p>0.05	p>0.05	p>0.05	P<0.05 $\downarrow$
M-(M+I/R)	P<0.05 $\uparrow$	P<0.05 $\uparrow$	P<0.05 $\uparrow$	p>0.05

Çizelge 4.1 ve Şekil 4-8 den de görüldüğü gibi SOD aktivitesi kontrole göre M grubunda anlamlı derecede düşük iken, I/R grubunda kontrole göre anlamlı derecede artış gözlemlendi (p<0.05). Ancak, kontrol grubuna göre M+I/R grubu karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde bir artış söz konusu olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdı (p>0.05). Ayrıca I/R grubuna göre M grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı iken (p<0.05), I/R grubuna göre M+I/R grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamsızdı (p>0.05).

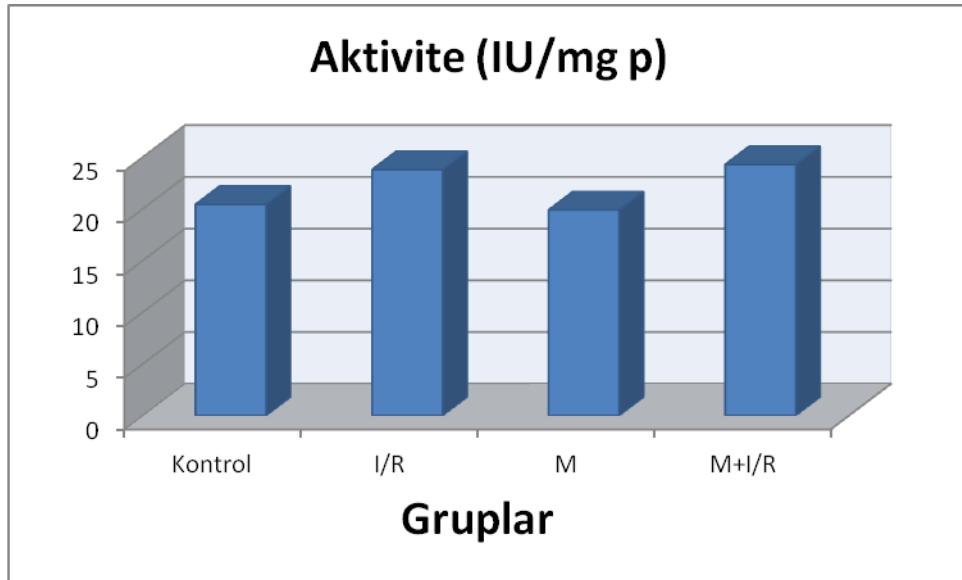
Gruplar arası CAT aktivitesi incelendiğinde kontrol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında M+I/R grubunda artma söz konusu olup, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenirken ($p<0.05$) diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişme gözlenmedi ($p>0.05$). Ayrıca I/R-M grubunda kontrole göre azalma, M-(M+I/R) grubunda ise artış olup istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).

GST enzim aktivitesi incelendiğinde, kontrol grubuna göre I/R ve M+I/R grubunda artış gözlenirken kontrol grubuna göre M grubunda anlamlı bir azalma görülmekteydi ($p<0.05$). Ayrıca I/R grubuna göre M grubunda anlamlı bir azalma gözlenirken M grubuna göre M+I/R grubunda ise artış olup istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$).

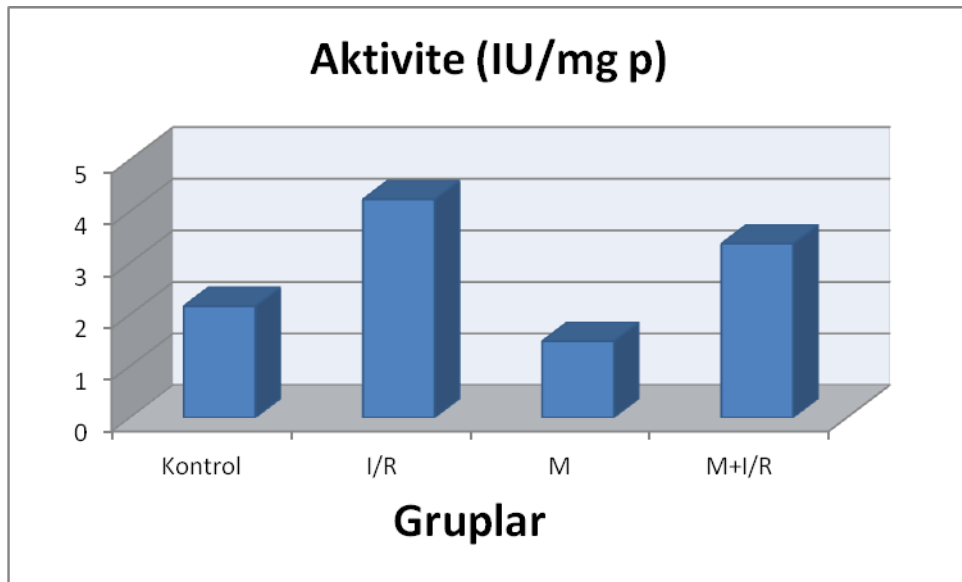
Gruplar arası MDA düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre I/R grubunda artış gözlenirken istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0.05$). Kontrol grubuna göre M ve M+I/R gruplarında azalma söz konusu olup istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Ayrıca M grubuna göre M+I/R grubunda bir azalma söz konusu olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0.05$).



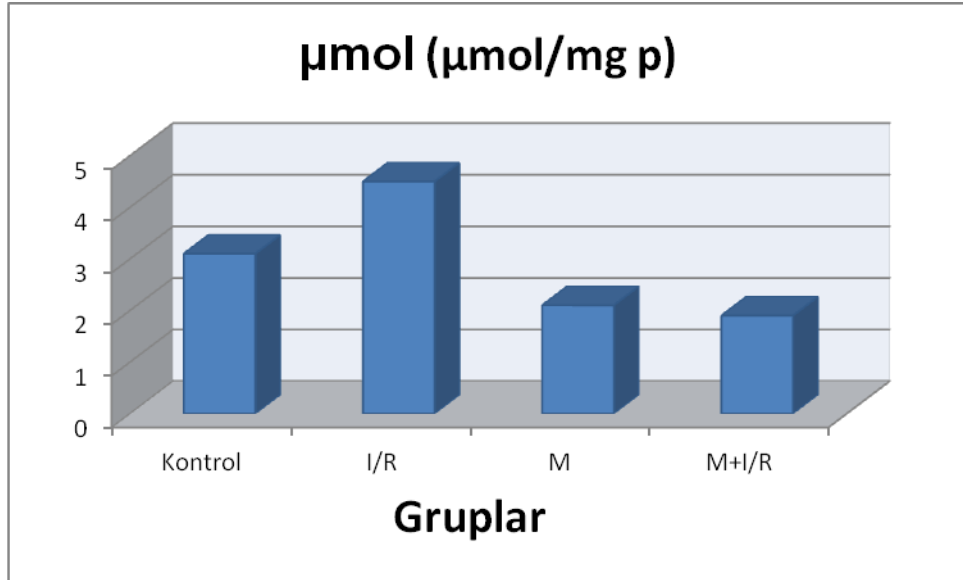
Şekil 4.1. Kontrol, I/R, M ve M+I/R verilen rat böbrek dokularına ait SOD aktiviteleri



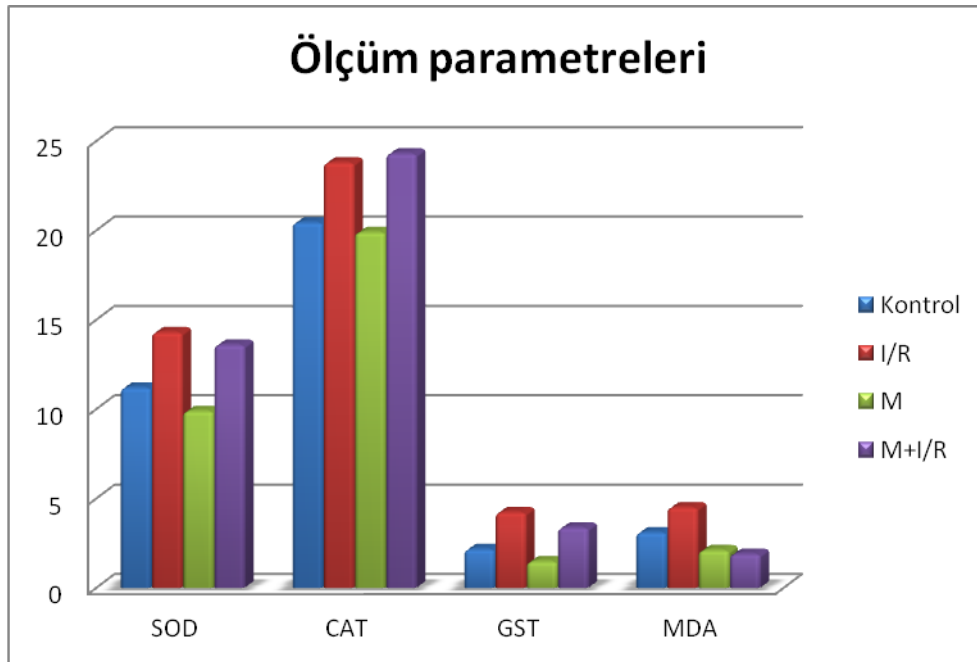
Şekil 4.2.Kontrol, I/R, M ve M+I/R verilen rat böbrek dokularına ait CAT aktiviteleri



Şekil 4.3.Kontrol, I/R, M ve M+I/R verilen rat böbrek dokularına ait GST aktiviteleri



Şekil 4.4.Kontrol, I/R, M ve M+I/R verilen rat böbrek dokularına ait MDA düzeyleri



Şekil 4.5.Kontrol, I/R, M ve M+I/R verilen rat böbrek dokularına ait enzim aktiviteleri

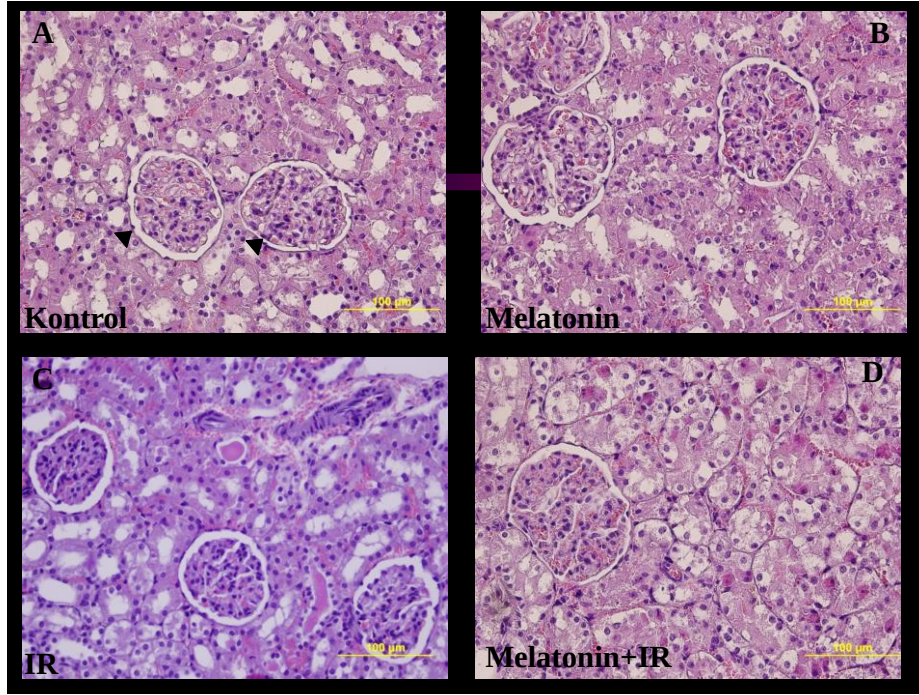
4.2. Histopatolojik Bulgular

4.2.1. Hematoksilen-Eozin ve PAS ile boyanmış böbrek dokusu kesitleri

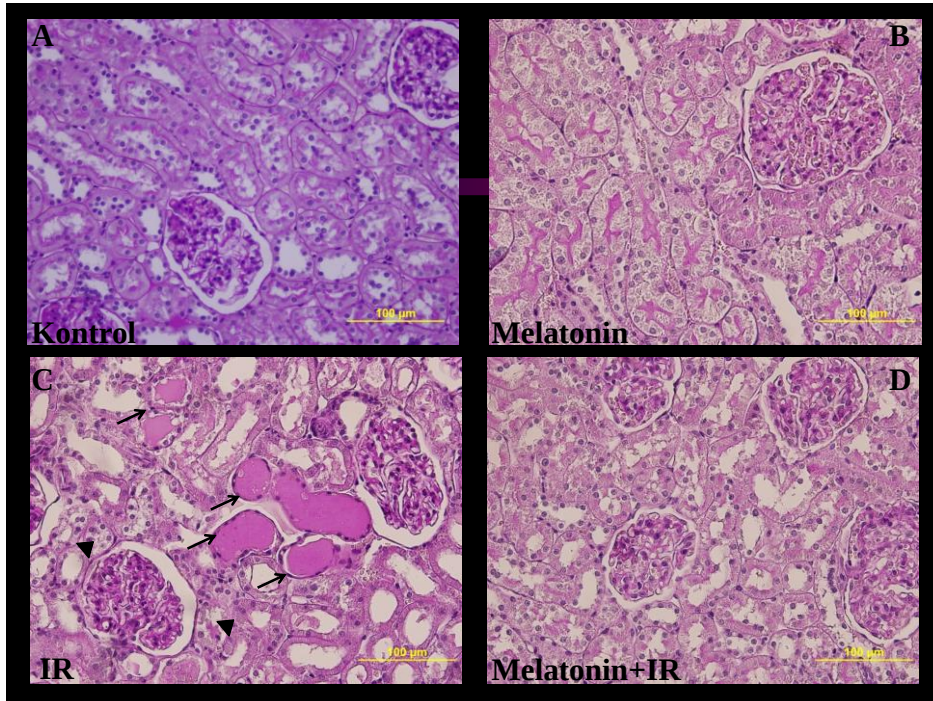
Işık mikroskopik değerlendirmede kontrol ve deney gruplarına ait olan böbrek dokuları değerlendirildi. Kontrol grubun böbrek kesitlerinde, doku parankimasında böbrek cisimcikleri (renal korpuskülleri), proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller, peritübüler kapillerler ve medullar ışınlar düzgün yerleşimliydi. Herhangi bir manüpülasyona maruz kalmayan bu grupta, glomerüller ve tübüller normal histolojik özellik gösterdi (Resim 4.1. ve 4.2).

İskemi/reperfüzyona maruz kalan grubun böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde, kontrol grubuna göre son derece önemli ve anlamlı dejereneratif değişiklikler gösterdiği gözlemlendi. Bu gruba ait böbrek dokularının histopatolojik incelenmesinde, hem interstisyel bağ dokusu alanlarında hem de renal korpusküllerin glomerüllerinde belirgin hemoraji incelendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tübül hücrelerinde de belirgin hasar mevcuttu. Ayrıca, I/R hasarına uğramış böbrek dokusunda tübülüs epitel hücrelerinde anlamlı nükleus kaybı saptandı. Özellikle de proksimal tübül epitel hücrelerinin apikal yüzeyindeki fırçamsı kenar kaybı PAS+ boyama ile oldukça belirgin gözlemlendi (Resim 4.1 ve 4.2).

İskemi/reperfüzyona maruz kalan gruba ait böbrek dokularında ağır renal hasar gözlenirken, melatonin uygulanan iskemi/reperfüzyon grubunda bu bulgularda önemli derecede bir azalma vardı.



Resim 4.1. Her bir gruptaki sıçan böbrek kesitindeki ışık mikroskopundaki görüntüsü (H&E). A-Kontrol grubu B-Melatonin uygulanan grup C-I/R uygulanan grup, D-I/R ve melatonin uygulanan grup (H&E; büyüklük, x400).



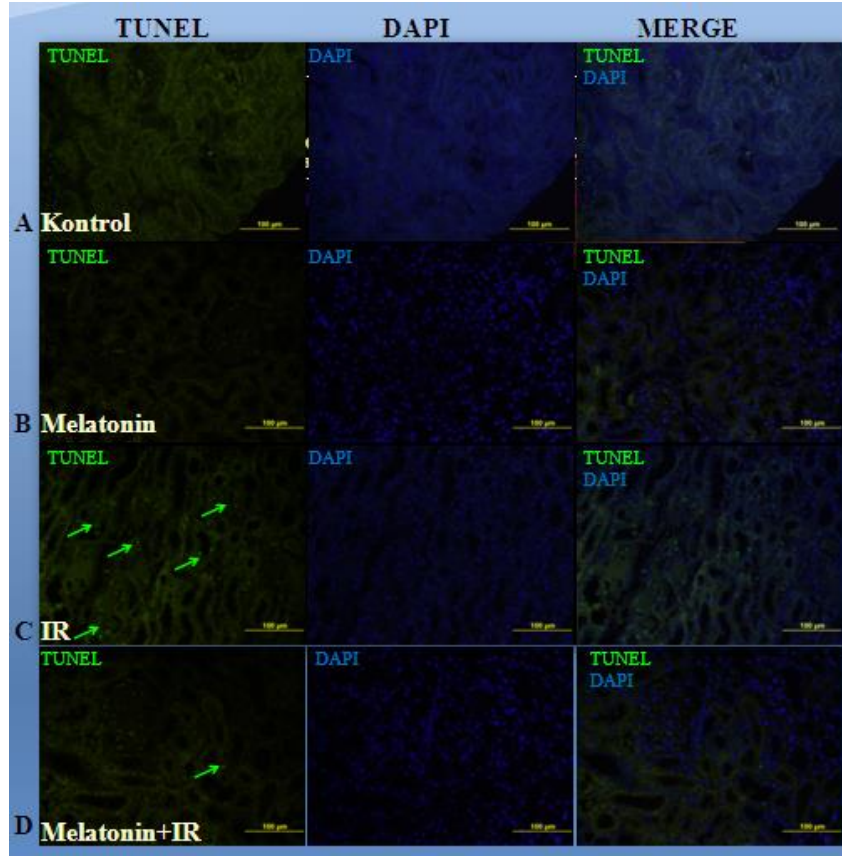
Resim 4.2. PAS ile boyanan kesitlerin fotomikrografik görüntüsü A-Kontrol grubu B-Melatonin uygulanan grup C-I/R uygulanan grup D-I/R ve melatonin uygulanan grup (PAS; büyüklük, x400).

4.2.2.Apoptozun değeriendirilmesi

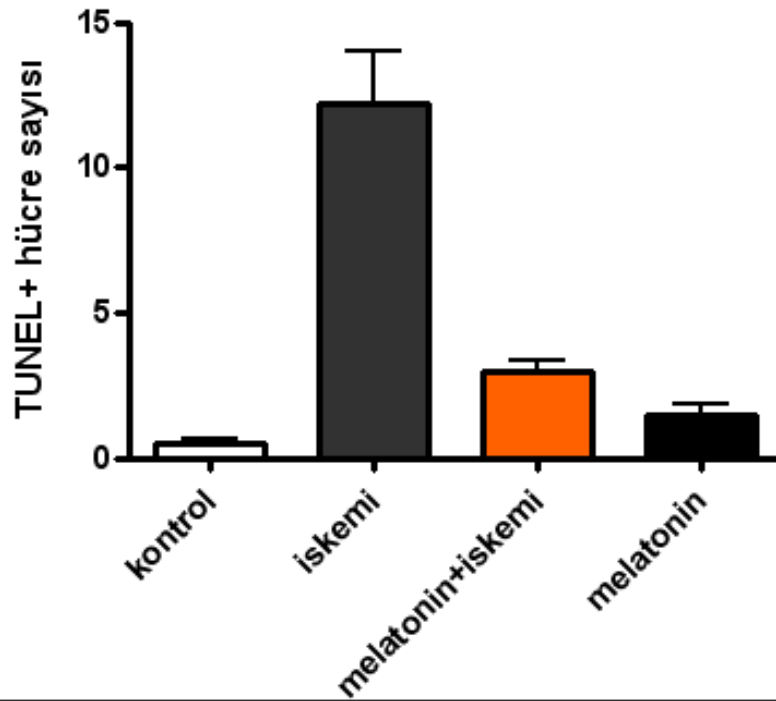
Apoptotik hücre sayıları her bir grup ve her bir denek için ayrı ayrı hesaplandı. TUNEL+ hücre sayısı iskemi reperfüzyon grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Melatonin grubunda ise TUNEL+ hücre sayısı kontrol grubuna yakındı.

Kontrol grubu herhangi bir manüplasyona maruz kalmadığı için TUNEL+ hücre sayısının ortalama değeri 2, melatonin grubundaki ortalama hücre sayısı 4, melatonin+I/R grubundaki ortalama hücre sayısı 3,5 ve I/R grubunda ise ortalama hücre sayısı 13 olarak tespit edildi. Kontrol grubunda ortalama hücre sayısı en düşük olması beklenen bir bulgudur. Gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol ve melatonin arasında fark gözlenmez iken I/R ile kontrol, I/R ile melatonin+I/R ve I/R ve melatonin grupları arasında anlamlı fark gözlendi [(p<0,05), (Şekil 4.6)].

Bu karşılaştırmada dikkate değer olan melatonin uygulanmış olan grubun uygulanmamış olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük TUNEL+hücre sayısına sahip olmasıdır. Bu bulgu da melatoninin iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu etkisine diğer bir önemli kanıtını göstermektedir. Ayrıca primer antikoru içermeyen negatif kontrol amacıyla kullanılan kesitlerde TUNEL pozitif işaretlenme gözlenmemiştir (Resim 4.3).



Resim 4.3.TUNEL ve yeşil immunofloresan yansıtan hücreler



Şekil 4.6.Her bir deneysel gruptaki TUNEL+hücre sayısını göstermektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Anaerobik oksidatif solunum son derece önemli ve hücreye zarar vererek ölüme neden olmaktadır. Hipoksinin en önemli nedeni arteriyel ya da venöz kan akımı bozukluğuna bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonuna yol açan iskemidir. Reperfüzyon, iskekiye maruz kalan doku ya da organların yeniden kanlanması ve oksijenlenmesi olayıdır. Reperfüzyon hasarı ise iskeki periyodunu izleyen yeniden kanlanma döneminde doku ya da organlarda meydana gelen hasar olarak tanımlanır. Hücre içine moleküler oksijenin girişiyle hızla oluşan serbest oksijen radikal (SOR) türevleri reperfüzyon hasarının nedenlerinden biridir [142].

Böbrek iskemisi; abdominal aorta yönelik cerrahilerde suprarenal klempaj sonrası, böbrek transplantasyonu kısmi nefrektomi, kardiyopulmoner bypass, sepsis, çeşitli ürolojik girişimler ve hidronefrozis gibi çeşitli klinik durumlarda görülür. İskemiden sonra gelişen akut böbrek yetmezliği, glomerüler filtrasyon hızında azalma, tübüler nekroz ve böbrek damarlarında direnç artışı ile karakterizedir. İskeki ve reperfüzyon sırasında; mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP'nin azalması, hücre içi Ca^{2+} artışı ve hücre iskeleti ile membran fosfolipitlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucu aşırı miktarda SOR oluşarak oksidatif strese neden olur. İ/R hasarının fizyopatolojisinde SOR'nin önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir [143,144]. Serbest radikaller nükleik asitler, serbest amino asitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbonhidratlar ve bağ dokusu makromolekülleri de dahil olmak üzere, canlı organizmaların yapısındaki hemen hemen tüm biyomoleküller ile reaksiyona girerek bunlar üzerinde geriye dönüşlü veya dönüşsüz etkiler meydana getirebilmektedirler [144]. İskeki sırasında küçük oranda SOR oluşmaktaysa da, reperfüzyon döneminde dokunun yeniden oksijenlenmesinin ardından daha fazla miktarda serbest radikal oluşmakta ve bunlar da lipid peroksidasyonuna yol açarak hasarı artırmaktadır [145].

Dokularda, oksidatif strese karşı enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere iki türlü antioksidan mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan enzimatik olanlardan en önemlileri SOD, CAT, GPx ve GST iken enzimatik olmayan ise GSH, hemoglobin vs'dır [146].

Böbrek kan akımındaki azalma veya kesilme ve sonradan oluşan reperfüzyon ile birlikte çeşitli derecelerde doku hasarı oluşmaktadır. Böbrek İ/R hasarında, iskemi sonrası böbrek fonksiyon bozukluklarında SOR en önemli rolü oynamaktadır [144]. Ayrıca reperfüzyonu takiben SOR'da hızla yükselme olduğu ve buna bağlı olarak lipid peroksidasyon düzeyinde artış olduğu bildirilmektedir [145]. Hücreler oksidatif hasarı önleyen ya da kısmen azaltan mekanizmalara sahiptir. Doku hasarının oluşması ile İskemik dokuda oksidanlara bağlı olarak iskemi süresince glutatyon miktarının azaldığı ve SOD, CAT ve GPx gibi enzimlerin inaktivasyonunun hızlandığı ve buna bağlı olarak hücrelerin reperfüzyon sırasında hızla oluşan oksijen radikallerinin etkisine daha duyarlı hale geldiği rapor edilmektedir. İ/R hasarının geriye dönebilmesi, böbrek tübüler hücrelerinin nefron boyunca hasarlı epitelyum hücrelerinin yerini alma ve yenilenme yeteneğine bağlıdır [147].

Memelilerde melatonin başta pineal bez olmak üzere over, lens ve kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur [3].

Melatonin en zararlı radikal olan $\cdot\text{OH}$ radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir oksidandır. Bu yüzden, günümüze kadar bilinen en güçlü antioksidan olarak kabul edilmektedir. Melatonin $\text{OH}\cdot$ radikali ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşerek ortamda bulunan $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterir [148].

Melatoninin antioksidan olarak önemli bir özelliği de lipofilik yapıda olmasıdır. Bu sayede hemen hemen hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabilmekte hatta kan-beyin bariyeri gibi bariyerleri de kolayca geçebilmektedir. Böylece çok geniş bir yayılımı antioksidan aktivite göstermektedir [149].

Yağmurca ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada melatonin verilen grubun Ginko Biloba (GB) uygulanan grup ile tübüler nekroz-atrofi, tübüler vakuoler değişiklikler ve glomerüler hasar parametreleri açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı, ancak vasküler konjesyon-trombozis ve interstisyel infiltrasyon parametreleri dikkate alındığında istatistiksel anlamlılık ifade edecek şekilde melatoninin daha iyi sonuç verdiğini belirtmektedir. Yine GB

uygulanan grubun tüm parametreler açısından sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında belirgin düzelme gösterdiği ve bununda istatistiksel olarak anlamlı olduğu nu göstermişlerdir [149]. Bizim çalışmamız da ise I/R'ye maruz kalan grubun böbrek dokusu kontrol grubuna göre anlamlı dejereneratif değişiklikler gösterdiği gözlemlendi. Bu gruba ait böbrek dokularında hem interstisyel bağ dokusu alanlarında hem de renal korpusküllerin glomerüllerinde belirgin hemoraji incelendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tübül hücrelerinde de belirgin hasar mevcuttu. Ayrıca, I/R hasarına uğramış böbrek dokusunda tübülüs epitel hücrelerinde anlamlı nükleus kaybı saptandı. Özellikle de proksimal tübül epitel hücrelerinin apikal yüzeyindeki fırçamsı kenar kaybı PAS+ boyama ile oldukça belirgin gözlemlendi. I/R grubuna ait böbrek dokularında ağır renal hasar gözlenirken, M+I/R grubunda bu bulgularda önemli derecede bir azalma vardı (Resim 4.1 ve 4.2).

Aktoz ve ark. yapmış olduğu çalışmada kontrol grubuna operasyondan 72., 48., 24. saat ve 30. dakika önce 1 mL/kg serum fizyolojik i.p. olarak vermişler. I/R, I/R+Melatonin ve IR+Vitamin E gruplarına ise iskemi oluşturmada önce 10 mg/kg melatonin ve 100 mg/kg vitamin E'yi sırasıyla 72., 48., 24. saatlerde ve 30. dakikada uygulamışlar. 60 dakikalık iskemiden sonra 60 dakika reperfüzyon sağlandıktan sonra kan örnekleri ve böbrek dokularını almışlar. I/R'de üre, kreatin ve MDA seviyelerinde önemli bir artış, SOD ve katalaz aktivitelerinde ise azalma olduğunu göstermişler. Histopatolojik bulgular ise IR grubu böbrek dokularında tübüler epitelyum tabakada kast olduğu ve tübüler nekroz olduğunu göstermişler. IR+Melatonin grubunda MDA seviyesinde önemli bir azalma olmasına karşın SOD aktivitesinde artma olduğunu gözlemlemişler. IR+Melatonin grubunda ise I/R grubuna göre tübüler nekroz ve kast şekillenmesinde dikkate değer bir azalma olduğunu belirlemişler. Sonuç olarak melatoninin fonksiyonel, biyokimyasal ve morfolojik hasara karşı koruyucu etki gösteren etkili bir antioksidan olduğunu göstermişlerdir [150]. Yapmış olduğumuz çalışmada SOD aktivitesi kontrole göre M grubunda anlamlı derecede düşük iken, I/R grubunda kontrole göre anlamlı derecede artış gözlemlendi. Ancak, kontrol grubuna göre M+I/R grubu karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde bir artış söz konusu olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdı. Ayrıca I/R grubuna göre M grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenirken, I/R grubuna göre M+I/R grubundaki azalma

ise istatistiksel olarak anlamsızdı. Gruplar arası CAT aktivitesi incelendiğinde kontrol grubu diğer gruplar ile karşılaştırıldığında M+I/R grubunda artma söz konusu olup anlamlı bir fark gözlenirken diğer gruplarda anlamsızdı. Gruplar arası MDA düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre I/R grubunda gözlenen artış istatistiksel olarak anlamsızdı. Kontrol grubuna göre M ve M+I/R gruplarında azalma söz konusu olup istatistiksel olarak anlamlıydı. Ayrıca M grubuna göre M+I/R grubunda bir azalma söz konusu olup istatistiksel olarak anlamsızdı. Biyokimyasal parametreler arasındaki farklılıklar melatonin etki etme süresine, dozuna ve I/R süresine bağlı olabilir.

Kurcer ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada böbrek I/R hasarında diyabet oluşturularak melatoninin koruyucu etkisini incelemişler. 15 gün boyunca melatonin 4 mg/kg/gün i.p olarak vermişler. Diğer gruplara göre kontrol grubunda MDA seviyesinin daha yüksek olduğunu bulmuşlar. Sonuç olarak böbrek I/R hasarı sonrasında melatoninin tedavi edici etkisini göstermişlerdir [151]. Çalışmamızda gruplar arası MDA düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre I/R grubunda artma, M ve M+I/R gruplarında ise azalma söz konusu olup melatonin dozu ve diyabet, parametreler arasındaki farklılığın nedeni olabilir.

Hagar ve ark. sol böbrekte 45 dakika iskemi 24 saat reperfüzyon ve sağ böbrek nefroktomisi yapılarak uygulanan modelde serum kreatinin ve üre düzeyleri ile MDA düzeylerinin I/R grubunda sham kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı GSH ve serum NO düzeyinin de anlamlı düzeyde azaldığı bildirilmiştir [152]. Bizim çalışmamızda da ortalama değer olarak MDA düzeyinin I/R grubunda kontrol grubuna göre arttığı gözlenmiştir. Bu durum I/R esnasında oluşan oksidatif strese bağlı olarak MDA düzeyindeki artış beklenen bir sonuç olup istatistiksel olarak da anlamlıydı.

Korkmaz ve Kolankaya'nın sıçanlarda sağ böbrek nefroktomisi yaptıkları ve sol böbrekte 45 dakika iskemi 3 saat reperfüzyon süresi uyguladıkları modellerinde MDA düzeylerinin arttığı ve GSH düzeyinin anlamlı azaldığı rapor edilmiştir [153]. Bizim çalışmamızda ise MDA düzeylerinin I/R grubuna göre M ve M+I/R gruplarına göre anlamlı bir azalma söz konusuydu.

Şener ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada böbrekte I/R oluşturarak melatoninin koruyucu etkisini araştırmışlar. Sıçanlara sağ nefrektomi yaptıktan sonra 45 dakikalık iskemiye maruz tuttuktan sonra sırasıyla 1, 3, 6, 24, 48 saat ve 1 hafta reperfüzyon gerçekleştirdiler. İskemiden 15 dakika önce 10 mg/kg melatoninini deri altından vermişler. Reperfüzyon sonucunda böbrek dokularını alarak histolojik incelemelerini ve MDA, GSH, MPO ve PO düzeylerine bakmışlar. GSH'da azalma; MDA, MPO ve PO'da ise artma olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak böbrek doku hasarına karşı melatoninin koruyucu etkisinin olabileceğini ifade etmişlerdir [153]. Bizim çalışmamızda MDA düzeyinin I/R grubunda kontrol grubuna göre artış gözlenirken, I/R grubuna göre M ve M+I/R gruplarına göre anlamlı bir azalma söz konusuydu.

Şener ve ark.'nın yapmış olduğu başka bir çalışmada bizim bulgularımıza paralel bir sonuç görülmektedir. 12 saatlik süre içerisinde 2 ve yarım saat süren iskemi oluşturmuşlar. Bu protokolü 3 gün tekrarlamışlar. Tedavi gruplarında 5 mg melatonin günde 2 kez reperfüzyon sırasında i.p olarak sıçana enjekte etmişlerdir. Böbrek dokularını alarak biyokimyasal parametrelere bakmışlar. Bunun sonucunda lokal tedavide MDA artışını melatoninin engellediği gözlemlenmiştir [154]. Bizim çalışmamızdaki bulgular lokal ve sistemik melatoninin uygulanmasının antioksidan etki göstererek böbrek dokusunu oksidasyona karşı koruduğunu göstermektedir.

Kurcer ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada erkek sıçanlara nefrektomi uygulandıktan sonra 1 saat iskemide bekletip 2 ve 24 saat reperfüzyonda bekletmişler. İskemiden 10 dakika önce 10 mg/kg melatoninini i.p.olarak hayvanlara enjekte etmişler. I/R böbrek MDA, MPO, TOS'da önemli bir artışa sebep olmuştur. Dolayısıyla böbrek I/R hasarındaki koruyucu etkisi melatoninin antioksidan özelliğinden kaynaklandığını göstermişler [155]. Bizim çalışmamızda MDA düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre I/R grubunda artış gözlenirken istatistiksel olarak anlamsızdı. Kontrol grubuna göre M ve M+I/R gruplarında azalma söz konusu olup istatistiksel olarak anlamlıydı. Ayrıca M grubuna göre M+I/R grubunda bir azalma söz konusu olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdı.

Bu durum melatoninin iskemiden 30 dk önce ve dozun 25 mg/kg olarak verilmesine bağlı olabilir.

Sezgin ve ark. böbrek I/R hasarı üzerine melatonin ve 1,25-dihydroxyvitamin D3 (VD3) etkisini araştırmışlar. Böbrek dokusunda MDA, GSH, NO seviyelerini ve SOD aktivitelerini değerlendirmişler. Böbrek I/R hasarı oluşturulan grup kontrol ile karşılaştırıldığında GSH seviyesi ve SOD aktivitesinde azalma NO seviyesinde ise artma olduğunu göstermişler. Bununla birlikte melatonin, VD3 ve melatonin+VD3 uygulanan gruplar I/R ile karşılaştırıldığında ise GSH seviyesi ve SOD aktivitesinde artma NO seviyesinde ise anlamlı olduğunu göstermişler. Ayrıca MDA seviyesine bakıldığında kontrol ve I/R grupları arasında bir fark yoktu. Fakat uygulanan tüm gruplar kontrol ve I/R gruplarıyla ile karşılaştırıldığında MDA seviyesinde azalma olduğunu vurgulamışlardır. Bu bilgilere dayanarak melatonin ve VD3'ün böbrek hasarı üzerine yararlı etkiye sahip olduğunu desteklediğini belirtmişler [156]. Yapmış olduğumuz çalışmada MDA seviyesine bakıldığında kontrol grubuna göre I/R grubunda artış gözlenirken istatistiksel olarak anlamsızdı. Diğer gruplar kontrol ve I/R gruplarıyla ile karşılaştırıldığında MDA seviyesinde azalma olduğu gözlemlendi. Bu azalmanın I/R sonrasında böbrekte oluşan hasara karşı melatoninin koruyucu etkisi olduğunu desteklemektedir. SOD aktivitesi kontrole göre M grubunda anlamlı derecede düşük iken, I/R grubunda kontrole göre anlamlı derecede artış gözlemlendi. Ancak, kontrol grubuna göre M+I/R grubu karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde bir artış söz konusu olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdı. Ayrıca I/R grubuna göre M grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı iken, I/R grubuna göre M+I/R grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamsızdı. Gruplar arası CAT aktivitesi incelendiğinde kontrol grubu diğer gruplar karşılaştırıldığında M+I/R grubunda artma söz konusu olup anlamlı bir fark gözlenirken diğer gruplarda anlamsızdı. GST enzim aktivitesi incelendiğinde, kontrol grubuna göre I/R ve M+I/R grubunda artış gözlenirken kontrol grubuna göre M grubunda anlamlı bir azalma görülmekteydi. Ayrıca I/R grubuna göre M grubunda anlamlı bir azalma gözlenirken M grubuna göre M+I/R grubunda ise artış olup istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu farklılık uygulanan melatonin antioksidan özelliği ile dozu ve VD3'ün etkisinden kaynaklanabilir.

Sinanoğlu ve ark. I/R sonrasında doku hasarına ve böbrek fonksiyon bozukluğuna öncülük eden biyokimyasal ve apoptotik olaylar üzerine melatonin ve VD3'ün koruyucu etkisine bakmışlar. Reperfüzyondan sonra böbrek dokularında histopatolojik ve biyokimyasal parametreleri değerlendirmişler. Ratlarda böbrek I/R hasarına karşı böbreklerdeki serum kreatin, BUN, alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz ve apoptoza bakmışlar. Buna ek olarak VD3 melatonin ile birlikte verilen grup melatonin ve VD3 tek başına verilen gruplarla karşılaştırıldığında ise apoptoz ve histolojik değişikliklerde önemli derecede bir azalma olduğunu belirtmişler. Böbrek tübüler apoptozu üzerine koruyucu etki melatonin ve VD3 beraber verildiğinde daha etkili olduğunu bulmuşlar [157]. Biz de çalışmamızda TUNEL+hücre sayısı I/R grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını, M grubunda ise TUNEL+hücre sayısı kontrol grubuna yakın olduğunu bulduk. Ayrıca gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol ve melatonin arasında fark gözlenmez iken I/R ile kontrol, I/R ile melatonin+I/R ve I/R ve melatonin grupları arasında anlamlı fark olduğunu gözlemledik.

Ahmadiasl ve ark. 10 mg/kg melatonin uyguladıktan sonra 45 dk iskemi oluşturup 24 saat reperfüzyon sonrasında SOD, CAT ve GPx düzeylerinin böbrek dokusunda azaldığını bulmuşlardır. Bu bulgu ile uyumlu olarak oksidatif strese benzer şekilde I/R sırasında ROS birikimi ve antioksidan enzim aktivitesinde azalma sonucunda protein, lipid ve DNA gibi hücre bileşenlerine hasar verdiğini göstermişlerdir. Ayrıca Mel+EPO birlikte kullanıldığı zaman SOD, GPx ve CAT düzeylerinde artış gözlemişlerdir [158]. Bizim çalışmamızda ise SOD ve CAT aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde kontrole göre I/R grubunda artma söz konusu olup SOD aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı iken CAT aktivitesi istatistiksel olarak anlamsızdı. Bu farklılık çalışmamızda uyguladığımız melatonin dozunun yüksek (25 mg/kg melatonin) oluşu ve iskemiden 30 dk önce verilmiş olmasından kaynaklanabilir. Çünkü hayvanlar kısa süreli ve yüksek dozda melatonine maruz kaldığından akut bir uygulama yapılmıştır.

Sehajpal ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada, iskemiden 30 dk önce 4 mg/kg melatonin ratlara uygulamışlar. Sonra ratın sol böbreğini 40 dk iskemiye maruz bıraktıktan sonra 24 saat reperfüzyonda bekletmişler. Daha sonra böbrek dokusunda oksidatif stres miyeloperoksidaz aktivitesi, tiobarbitürik asit reaktif

maddeler, süperoksit anyon üretimi, glutatyon düzeyi ve katalaz aktivitesi ölçümlerini değerlendirmişler. Buna göre GSH aktivitesi açısından değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre I/R grubunda azalma olduğunu tespit etmişlerdir [159].

Biyokimyasal parametreler olarak SOD, CAT ile GST enzim aktivitelerine ve MDA düzeyine bakıldı. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda SOD, CAT ve GST enzim aktivitelerine baktığımızda melatonin grubu (III.grup) hariç diğer gruplarda bir artış söz konusuydu. Bu durum I/R sonrasında oluşan oksidatif stres sonucunda böbrek dokularında hasar oluşumuna karşı uygulanan melatoninin kısa süreli olup akut bir hasar oluşturmaya bağlı olabilir.

Histopatolojik olarak böbrek dokularını incelediğimizde ise İskemi/reperfüzyona maruz kalan grubun böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde, kontrol grubuna göre son derece önemli ve anlamlı dejereneratif değişiklikler gösterdiği gözlemlendi. Bu gruba ait böbrek dokularının histopatolojik incelenmesinde, hem interstisyel bağ dokusu alanlarında hem de renal korpusküllerin glomerüllerinde belirgin hemoraji incelendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tübül hücrelerinde de belirgin hasar mevcuttu. Ayrıca, I/R hasarına uğramış böbrek dokusunda tübülüs epitel hücrelerinde anlamlı nükleus kaybı saptandı. Özellikle de proksimal tübül epitel hücrelerinin apikal yüzeyindeki fırçamsı kenar kaybı PAS+ boyama ile oldukça belirgin gözlemlendi. İskemi/reperfüzyona maruz kalan gruba ait böbrek dokularında ağır renal hasar gözlenirken, melatonin uygulanan iskemi/reperfüzyon grubunda bu bulgularda önemli derecede bir azalma vardı.

TUNEL boyama yöntemi ile hücre sayıları her bir grup ve her bir denek için ayrı hesaplanarak iskemi reperfüzyon grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış olduğu gözlemlendi. Bu karşılaştırmada dikkate değer olan melatonin uygulanmış olan grubun uygulanmamış olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük TUNEL+ hücre sayısına sahip olmasıydı. Bu bulgu da melatoninin iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu etkisine diğer bir önemli kanıtını göstermektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmamızda dişi sıçanlara I/R reperfüzyon uygulayarak böbrek dokularında hasar meydana getirerek melatoninin koruyucu etkisine bakıldı. Biyokimyasal parametreler açısından diğer araştırmacıların yapmış olduğu çalışmalarla kıyaslandığında SOD, CAT ile GST enzim aktivitelerinde ve MDA düzeyinde istatistiksel analiz sonucunda anlamlı değerler elde edildi. Bu durum I/R'nin oluşturduğu oksidatif stres sonucunda böbrek dokularında hasar meydana getirdiğini göstermiştir. Böbrek dokusunda oluşan hasar melatoninin koruyucu etkisinden yararlanılıp kısa süreli uygulanarak akut bir hasar oluşturulmuştur. Oluşan bu hasar histopatolojik açıdan değerlendirildiğinde ise melatoninin anlamlı bir koruyucu etkisi olduğunu desteklemektedir. Bu farklılıklar dişi hayvan kullanımı, iskemi ile reperfüzyon süresine, melatonin dozuna veya iskemiden önce melatoninin verilme süresine bağlı olabilir.

Sonuç olarak melatoninin I/R hasarında, apoptozdaki etkilerinin mekanizmasını, apoptozda oksidatif stresin önemini ve melatoninin antioksidan etkisini ortaya çıkarmıştır. Günümüzde serbest radikallerin kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere çeşitli patolojilerde ve yaşlanmadaki rollerinin gösterilmesi antioksidan kullanımını gündeme getirmiş ve bu konuda çalışmalar giderek hız kazanmıştır. Melatonin diğer pek çok antioksidan ile kıyaslandığında gerek güçlü radikal süpürücü etkisi gerek antioksidan enzim aktivitelerini artırıcı özelliği ile güncelliğini korumaktadır.

KAYNAKLAR

1. Zimmerman BJ, Granger DN. (1992). Reperfusion injury. *Surg Clin North Am*, 72, 65-83.
2. Conesa LE, Valero F, Nadal JC ve ark. (2001). N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *Am J Physiol*, 281, 730-73.
3. Reiter RJ. (1995). Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*; 9, 526-533.
4. Reiter RJ. (1993). Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian Journal Medicine Biology Researc*, 26, 1141-1155.
5. Baykara B. (2006). Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında karnozin ve melatoninin koruyucu etkileri. Uzmanlık Tezi, İzmir.
6. Arıncı K, Elhan A. (2005). *Anatomi*, 1. cilt, (4. Baskı) Güneş Kitabevi, Ankara, s,311-316.
7. Özdamar S, Sorkun H. *Genel Embriyoloji*, Erciyes Ünivewrsitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Kayseri No:4.
8. Moore KL. (1988). *The Developing human*. (4th ed.) Philadelphia: Saunders Co. 262-267.
9. Gövsa F.G, (2008). *Sistematik Anatomi*, İzmir Güven Kitabevi, İzmir s,532-536.
10. Putz R, Pabst R. (2001). *Sobotta İnsan Anatomisi Atlası*, (5. Baskı) Münih, Beta Basım Dağıtım. s,179.
11. Warren F. Walker, Jr. and Dominique G. Homberger. (1997). *Anatomy and dissection of the rat*, Third Edition, s:65-66.
12. L.carlos Junqueria Jose Carneiro Robert O. Kelley. (1998). *Temel Histoloji*, s: 359-373.
13. Abuja P.M, Albertini R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Act*, 306, 1-17.
14. Word RJ, Peters TJ. (1996). Free radicals. Kaplan LA, Pesce AJ editors. *Clinical chemistry*. (3th Ed.) Mosby Year Book, Inc. pp,765-777.

15. Yeum KJ, Russell MR, Krinsky IN, Adlini G. (2004). Biomarkers of antioxidant capacity in hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; pp,430, 97-103.
16. Dormandy T L. (1983). An approach to free radicals. *Lancet*, 322, 1010-1013.
17. Kaynak K. (2002). Akciğer kanserinde oksidatif hasarın rolü. *Solunum*, 4(4), 468-473.
18. Halliwell B, Gutteridge JM. (1989). *Free radicals in biology and medicine*. (2th Ed.) Oxford: Clarendon Pres. pp, 125.
19. Zwart De LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 202-226.
20. Aslan R, Şekeroğlu MR, Bayiroğlu F. (1995). Serbest Radikal Türlerin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Antioksidan Savunma, *Y.Y.Ü Sağlık Bil Derg*, 2(1), 137-142.
21. Byung PY. (1994). Cellular Defenses Against Damage from Reactive Species. *Physiological Review*. 74(1), 139-172.
22. Young I.S, Woodside J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54, 176-186.
23. Clarkson PM, Thompson HS. (2000). Antioxidants: What role do they play in physical activity and health?. *Am J Clin Nutr*, 72, 637-46.
24. Acworth IN, Bailey B. (1997). Reactive Oxygen Species. In: The handbook of oxidative metabolism. *Massachusetts*, ESA Inc; pp. 1-1 to 4-4.
25. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem* ,. 219, 1-14.
26. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1990). Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An overview. *Methods Enzymol*, 49(3), 577-587.
27. Fridovich I. Oxidative Stres. (2001). *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group.
28. Nordberg J, Arner ESJ. (2001). Reactive Oxygen Species, Antioxidants and The Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1287-1317.

29. Kurutaş Belge E, İnanç Güler F, Kılınç M. (2004). Serbest Radikaller. Arşiv. 13, 120-13.
30. Zimmerman BJ, Granger, D N. (1994). Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci*, 307, 284–292.
31. Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins LW, Povlishock J T, Rowe GT, et al. (1985). Appearance of superoxideanion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ. Res*, 57, 142–151.
32. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. (1999). Endothelial function in hypertension. *Hypertension* 34, 539–545.
33. Oruç ÖE. (1998). 2,4-Diamin ve Azinfosmetilin Tilapia Nilotica'da Karaciğerde Antioksidan Enzim Aktivitelerine ve Lipid Peroksidasyonuna Etkileri. Doktora Tezi, Adana.
34. Gutteridge J M C. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chemistry*, 41, 1819-1828.
35. Hinder RA, Stein HJ. (1991). Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg*, 126, 104-105.
36. Akkuş İ. (1995). Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, Konya. ss:1-15.
37. Ünal BB. (1999). Talasemi ve G6PD Enzim Eksikliğinde MDA Düzeyi. Uzmanlık Tezi, Adana.
38. Dildar Konukoğlu. (1997). Serbest radikaller ve önemleri. *Aile Hek Derg*, 1(4), 197-200.
39. Kanofsky JR. (1989). Singlet oxygen production by biological systems. *Chem Biol Interact*, 70, 1-28.
40. Floyd RA. (1990). Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J*, 4: 2587-97.
41. Meram İ, Aktaran Ş. (2002). Serbest Radikallerin Biomoleküller Üzerine Etkileri. Arşiv. 11, 299.
42. Özkan A, Fışkın K. (2004). Serbest Oksijen Radikalleri, Karsinogenez ve Antioksidant Enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*. 14, 52-60.
43. Thomas MJ. (2000). The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working?. *Critical Reviews in Food Sci Nutrition*, 32, 21-39.

44. Cighetti G, Duca L, Bortone L, Sala S, Nava I, Fiorelli G, et al. (2002). Oxidative Status and Malondialdehyde in β -thalassaemia Patients. *European Journal of Clinical Investigation*, 32, 55-601.
45. Dilek ON. (2003, 23-30 Mart). Serbest Radikaller ve Cerrahi. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği III. Ulusal Kongresi, Afyon.
46. Urso ML, Clarkson MP. (2003). Oxidative stres, exercise, and antioxidant supplemetation. *Toxicology*, 189, 41-54.
47. Church DF, Pryor WA. (1985). Free Radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspec*, 64, 111-126.
48. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. (1996). Renal ischaemia—reperfusion injury. *Br J Surg*, 83, 162-170.
49. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. (2009). Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg*, 22, 46-55.6.
50. Donna L. Carden D, Neil Granger. (2000). Pathophysiology of ischeamia-reperfusion injury. *J Pathol*, 190, 255-266.
51. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. (2002). Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*, 105(2), 248-58.
52. Siesjö BK. (1988). Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit. Care Med*, 16, 954-63.
53. Lehninger AL. (1971). Generation of ATP in anaerobik cell. In *Bioenergetics*.ed 2 Menlo park, Calif:WA Benjamin. ss: 53-71.
54. Karabiga M. (2006). Aprotininin Deneysel Aortik İskemi Reperfüzyon Modelinde Böbrek Hasarı Üzerine Etkisi. Uzmanlık Tezi, Isparta.
55. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 112(4), 481-90.
56. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. (2004). Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th edition. Philadelphia, Saunders.
57. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*, 15;28(10), 1456-62.

58. Charles D. Collard, Simon Gelman. (2001). Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*, 94, 1133-8.
59. Parks DA, Granner DN. (1986). Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol*, 250, G749-53.
60. Li C, Jackson RM. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(2), C227-41.
61. Mc Cord J, Franklin H. (1985). Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Eng J Med*, 312(39), 159-163.
62. Orrenius S, Ankarcrona M, Nicotera P. (1996). Mechanisms of calcium-related cell death: *Adv Neurol*, 71, 137-49.
63. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. (1997). Post-ischemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 14, 195-203.
64. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. (2001). Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundam Clin Pharmacol*, 15, 293-306.
65. Şener G, Yeğen B Ç. (2009). İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim*, 22(3), 5-13.
66. Antmen Ş. E. (2005). Beta talasemide oksidatif stres. Yüksek Lisans Tezi, Adana.
67. Sorg O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or biological reality? *C R Biologies*, 327, 649-662.
68. Lucente G, Luisi G, Pinnen F. (1998). Design and Synthesis of Glutathione Analogues. *Il Farmaco*, 53, 721-735.
69. Sies H. (1999). Glutathione and Its Role in Cellular Functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 916-921.
70. Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, Zanden J, Bladeren PJ. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10, 141-152.
71. Knapen MFCM, Zusterzeel PLM, Peters WHM, Steegers EAP. (1999). Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 82, 171-184.

72. Hall L, Williams K, Perry ACF, Frayne J, Jury JA. (1998). The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. *Biochem J*, 333, 5-9.
73. Haan JB, Bladier C, Griffith P, Keiner M, O'shea RD, Kola İ. (1998). Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *Issue of August*, 273(35), 22528-22536.
74. Strange RC, Spiteri MA, Ramchandran S, Fryer AA. (2001). Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research*. 482, 21-26.
75. Oberley L.W. (1982). Representative of Polypeptid Structure of Bovine CuZnSOD. Superoxide Dismutase.1:28.
76. Kinnula VL, Paakko P, Soini Y. (2004). Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. *FEEBS*; pp,1-6.
77. Kinnula VL, Crapo JD. (2004). Superoxide Dismutases in Malignant Cells and Human Tumors. *Free Radical Biology and Medicine*. 36(6), 718-744.
78. Zamocky M, Koller F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 72, 19-66.
79. Ernster L, Dallner G. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta*. 1271, 195–204.
80. Xia L, Björnstedt M, Nordman T, Eriksson LC, Olsson J M. (2001). Reduction of ubiquinone by lipoamide dehydrogenase. An antioxidant regenerating pathway. *Eur J Biochem*, 268, 1486–1490.
81. Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. (1990). Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Av Exp Med Biol*, 264, 155-163.
82. Sies H, Stahl W. (1992). Sundquist AR. Antioxidant function of vitamins. Vitamin E and C, betacarotene and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*, 669, 7-20.
83. Tadmouri GO, Başak AN. (2001). B-thalassemia in Turkey. A review of the clinical epidemiological molecular and evolutionary aspects. *Hemoglobin*. 25(2), 227-239.

84. Burtis CA, Ashwood ER. (2005). Vitaminler. Aslan D. Eds. Klinik Kimyada Temel İlkeler. Ankara: Palme Yayınları, ss,548-550, 332-333,578-601.
85. Nijveldt RJ, Noad E, Hoarn DEC, Boelens PG, Norren K, Leeuwen PAM. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 74, 418-425.
86. Onat T, Eerk K, Sözmen YE. (2002). İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık. 135, 535-536.
87. Becker MA, Roessler BJ. (1995). Hyperuricemia and Gout. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, New York: 7th Ed. McGraw-Hill. pp,1655-1677.
88. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Amer Chem Soc*, 80, 2587.
89. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. (2006). Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol*, 38, 313-316.
90. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D.A (1995). Review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res*, 19, 149-165.
91. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, Pawlik M, Sliwowski Z, Cześnikiewicz-Guzik M, et al. (2007). Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol*, 58, 381-405.
92. Şener G. (2010). Karanlığın hormonu: Melatonin. *Marmara Eczacılık Dergisi*. 14, 112-120.
93. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh C-S. (1997). Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res*, 29, 363-372.
94. Reiter RJ. (1991). Neuroendocrine effects of light. *Int J Biometeorol*, 35, 169-175.
95. Arendt J, Skene DJ. (2005). Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*, 9, 25-39.
96. Schulz P, Steimer T. (2009). Neurobiology of circadian systems. *CNS Drugs*, 2, 3-13.
97. Liebmann PM, Wölfler A, Felsner P, Hofer D, Schauenstein K. (1997). Melatonin and the immune system. *Int Arch Allergy Immunol*, 112, 203-211.

98. Campino C, Valenzuela F, Arteaga E, Torres-Farfán C, Trucco C, Velasco A, et al. (2008). Melatonin reduces cortisol response to ACTH in humans. *Rev Med Chil*, 136, 1390-1397.
99. Millet B, Touitou Y, Poirier MF, Bourdel MC, Amado I, Hantouche EG, et al. (1999). Obsessive-compulsive disorder: evaluation of clinical and biological circadian parameters during fluoxetine treatment. *Psychopharmacology*, 146, 268-274.
100. Guardiola-Lemaitre B. (2007). Melatonergic receptor agonists and antagonists: therapeutic perspectives. *J Soc Biol*, 201, 105-113.
101. Claustat B, Brun J, Geoffriau M, Chazot G. (1998). Melatonin: from the hormone to the drug? *Restor Neurol Neurosci*, 12, 151-157.
102. Lino A, Silvy S, Condorelli L, Rusconi AC. (1993). Melatonin and jet lag: treatment schedule. *Biol Psychiatry*, 34, 587.
103. Waldhauser F, Frisch H, Waldhauser M, Weiszenbacher G, Zeitlhuber U, Wurtman R. (1984). Fall in nocturnal serum melatonin during prepuberty and pubescence. *Lancet*. 1, 362-365.
104. Tan DX, 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.
105. Touitou Y, Auzéby A, Camus F, Djeridane Y. (2009). Daily profiles of salivary and urinary melatonin and steroids in healthy prepubertal boys. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 22, 1009-1015.
106. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yeğen BC, Sener G. (2003). Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res*, 34, 282-287.
107. Song Y, Chan CW, Brown GM, Pang SF, Silverman M. (1997). Studies of the renal action of melatonin: Evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of the Mel1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule. *FASEB J*, 11, 93-100.
108. Dubovich ML. (1995). Melatonin receptors: Are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci*, 16, 50-56.
109. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. (1998). Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery. *Biochem Pharmacol*, 56, 1265-1272.

110. Vijayalaxmi, Thomas CR Jr, Reiter RJ, Herman TS. (2002). Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol*, 20, 2575-601.
111. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. (1994). Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci*, 55, 271-276.
112. Escames G, Guerrero JM, Reiter RJ, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A, Ortiz GG, et al. (1997). Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Neurosci Lett*, 230, 147-150.
113. Reiter RJ, Tan D-X, Osuna C, Gitto E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci*. 7, 444-458.
114. Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. (2007). Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol*, 54, 1-9.
115. Reiter RJ, Tan DX, Erren TC, Fuentes-Broto L, Paredes SD. (2009). Light-mediated perturbations of circadian timing and cancer risk: a mechanistic analysis. *Integr Cancer Ther*, 8, 354-360.
116. Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. (2009). Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 44, 175-200.
117. Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C. (1997). Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sci*, 10, 169-174.
118. Şener G, Sehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yeğen BC. (2002). The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Pineal Res*, 32, 120-126.
119. Şener G, Sehirli AO, Satiroğlu H, Keyer-Uysal M, C Yeğen B. (2002). Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Burns*, 28, 419-425.
120. Şener G, Tosun O, Sehirli AO, Kaçmaz A, Arbak S, Ersoy Y, Ayanoğlu-Dülger G. (2003). Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci*, 72, 2707-2718.
121. Şener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanli G, Kaçmaz A, Tilki M, Yeğen BC. (2005). Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg Today*, 35, 52-59.

122. Kaçmaz A, User EY, Sehirli AO, Tilki M, Ozkan S, Sener G. (2005). Protective effect of melatonin against ischemia/reperfusion-induced oxidative remote organ injury in the rat. *Surg Today*, 35, 744-750.
123. Cuzzocrea S, Reiter RJ. (2001). Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*, 426, 1-10.
124. Reiter RJ, Maestroni JM. (1999). Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation. *J Mol Med*, 77, 36-39.
125. Maestroni GJM. (1995). The immunoendocrine role of melatonin. *J Pineal Res*, 19, 149-165.
126. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. (2000). Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 917, 376-386.
127. Sewerynek E. (2002). Melatonin and the cardiovascular system. *Neuro Endocrinol Lett*, 1, 79-83.
128. Dubocovich ML, Markowska M. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27, 101-110.
129. Paulis L, Simko F. (2007). Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. *Physiol Res*, 56, 671-684.
130. Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D, Staszewicz P, Szapska B, et al. (2002). The influence of pinealectomy and melatonin administration on the dynamic pattern of biochemical markers of bone metabolism in experimental osteoporosis in the rat. *Neuro Endocrinol Lett*, 1, 104-109.
131. Suzuki N, Somei M, Seki A, Reiter RJ, Hattori A. (2008). Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. *J Pineal Res*, 45, 229-34.
132. Şener G, Goren FO, Ulusoy NB, Ersoy Y, Arbak S, Dülger GA. (2005). Protective effect of melatonin and omeprazole against alendronat-induced gastric damage. *Dig Dis Sci*, 50, 1506-12.
133. Tresguerres JA, Kireev R, Tresguerres AF, Borrás C, Vara E, Ariznavarreta C. (2008). Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 108, 318-326.

134. Bubenik GA, Blask DE, Brown GM, Maestroni GJ, Pang SF, Reiter RJ, et al. (1998). Prospects of the clinical utilization of melatonin. *Biol Signals Recept*, 7, 195-219.
135. Carrillo-Vico A, Reiter RJ, Lardone PJ, Herrera JL, Fernández-Montesinos R, Guerrero JM, al. (2006). The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investig Drugs*, 7, 423-431.
136. Karbownik M, Lewinski A, Reiter RJ. (2001). Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *Int J Biochem Cell Biol*, 33, 735-753.
137. Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L, Randall R. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 182, 265-275.
138. Van Ye TM, Roza AM, Pieper GM, Henderson J Jr, Johnson JP, Adams MB. (1993). Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphological damage. *J Surg Res*, 55, 553-558.
139. Aebi H. (1984). Catalase invitro assay methods. *Methods in Enzymology*, 105, 121-6.
140. Durak İ., Yurtarlanı Z., Canbolat O., et al., (1993). A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin. Chim. Acta*, 214, 103-4.
141. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249, 7130-9.
142. Akkoç H. (2008). Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Dicle Tıp Dergisi*, 35 (3), 211-215.
143. Aydogdu N, Kaymak K, Yalçın Ö. (2005). Sıçanlarda Böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında N-asetilsisteinin etkileri. *Fırat Tıp Dergisi*, 10, 151-155.
144. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. (1984). Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in rat. *J Clin Invest*, 74, 1156-1164.
145. Paller MS. (1994). The cell biology of reperfusion injury in the kidney. *J Invest Med*, 42, 632-639.

- 146.Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. (2000). Kidney ischemia-reperfusion: Modulation of antioksidant defenses. *Mol Cell Biochem*, 205, 1-11.
- 147.Nath KA, Norby SM. (2000). Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med*, 109, 655-678.
- 148.Yalçın S. (1998). Antioksidanlar. *Klinik Gelişimi*, 11, 342-6.
- 149.Yağmurca M, Baş O, Şahin Ö, Nacar A, Yüksel Ş, Narcı A. (2007). Ratlarda sisplatin ile indüklenmiş böbrek hasarına karşı melatonin ve ginkgo bilobanın koruyucu etkileri. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 8, 29-34.
- 150.Aktoz T, Aydogdu N, Alagol B, Yalcin O, Huseyinova G, Atakan IH. (2007). The protective effects of melatonin and vitamin E against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Ren Fail*. 29(5), 535-42.
- 151.Kurcer Z, Parlakpınar H, Vardi N, Tasdemir S, Iraz M, Fadillioglu E, Baba F, Gül M. (2007). Protective effects of chronic melatonin treatment against renal ischemia/reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 115(6), 365-71.
- 152.Hagar HH, Abd El Tawab R. (2012). Cysteinyl leukotriene receptor antagonism alleviates renal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res*. 178(1), 25-34.
153. Korkmaz GG1, Uzun H, Cakatay U, Aydın S. (2012). Melatonin ameliorates oxidative damage in hyperglycemia-induced liver injury. *Clin Invest Med*, 35(6), E370-7.
- 154.Şener G, Sert G, Şehirli AÖ, Arbak S, Gedik N, Ayanoğlu-Dülger G. (2006). Melatonin protects against pressure ulcer-induced oxidative injury of the skin and remote organs in rats. *J Pineal Res*, 40, 280–287.
- 155.Kurcer Z, Oguz E, Özbilge H, Baba F, Aksoy N, Çelik H ve ark. (2007). Melatonin protects from ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats: this effect is not mediated by proinflammatory cytokines. *J Pineal Res*, 43, 172–178.
- 156.Sezgin G, Oztürk G, Güney S, Sinanoğlu O, Tunçdemir M. (2013). Protective effect of melatonin and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Ren Fail*, 35(3), 374-9.
- 157.Sinanoglu O, Sezgin G, Ozturk G, Tuncdemir M, Guney S, Aksungar FB, Yener N. (2012). Melatonin with 1,25-dihydroxyvitamin D3 protects against

apoptotic ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Ren Fail*, 34(8):1021-6.

158. Ahmadiasl N, Banaei S, Alihemmati A (2013). Combination antioxidant effect of erythropoietin and melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Science*, 16, 1209-1216.
159. Sehajpal J, Kaur T, Bhatti M R, and Singh A P (2014). Role of progesterone in melatonin-mediated protection against acute kidney injury. *Journal of Surgical Research*, 1-7.

EKLER

EK-1:

ETİK KURUL RAPORU

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE

ETİK KURULUN ADI: Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

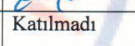
ETİK KURULUN ADRESİ: Deneysel Araştırmalar uygulama ve Araştırma Merkezi (DEKAM)

Tarih: 13.11.2013

Toplantı Sayısı: 11

Karar No: 13/133

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu **13.11.2013** tarihinde **Prof. Dr. Harun ÜLGER**'in başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Harun ÜLGER	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Abdullah İNCİ	Prof. Dr.	Veteriner Fak.	
Özlem CANÖZ	Prof. Dr.	Tıp Fak.	Katılmadı
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Prof. Dr. Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fak.	
Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fak.	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fak.	
Gökçen Yuvalı ÇELİK	Doç. Dr.	Eczacılık Fak.	
Servet KESİM	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fak.	
Gökçen DİNÇ	Yrd. Doç. Dr.	DEKAM	
Serap ALTUNDAŞ EROĞLU	Av.	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Katılmadı
Asiye GÖKBELLEN	Yardımcı Öğretim Üyesi	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	Katılmadı

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesinden **Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU** tarafından sunulan “**Rat böbrek dokularında serbest radikal metabolizmasının araştırılması: melatonin etkisi**” adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi

Tarih : 13.11.2013

Etik kurul Başkanı : Prof. Dr. Harun ÜLGER

İmzası : 

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : NİSARİ, Mustafa
Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi : 05/12/1975, Kayseri
ve yeri
Medeni hali : Evli

Telefon : 0 (352) 4315503

Faks : 0 (352) 4315503

e-posta : mustafa.nisari@dogan.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı	2005
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	1997

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2008-2009	TBMM Meclis	İdare Amiri Danışmanlığı
2008-2011	Uğur Dershaneleri	Biyoloji Bölüm Başkanlığı
2014 (Devam ediyor)	Doğa Koleji	Lise Müdürü

Yabancı Dili : İngilizce (KPDS:58)



GAZİ GELECEKTİR...



Gazi gelecektir ...

