

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA KASTAKİ İSKEMİ-REPERFÜZYON
HASARINDA ÇİNKO VE MELATONİNİN ETKİSİ**

Mehmet ÇELER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**Danışman
Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ**

KONYA-2016

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA KASTAKİ İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA ÇİNKO VE MELATONİNİN ETKİSİ

Mehmet ÇELER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 13202046 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2016

S.Ü Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne,

Mehmet ÇELER tarafından savunulan bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Neyhan ERGENE

Karatay Üniversitesi

İmza

Danışman: Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ

Selçuk Üniversitesi

İmza

Üye: Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI

Selçuk Üniversitesi

İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim kurulu..... tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Gerçekleştirdiğimiz tezin araştırma konusu olan serbest radikaller, aerobik solunum yapan canlılarda fizyolojik olarak da oluşabildiği için normalden fazla üretim canlı organizma için kaçınılmaz olarak zararlar oluşturur. Bu nedenle özellikle son yıllarda oldukça yaygın şekilde araştırmalar yapılmaktadır. Uygun konsantrasyonlarda yararlı etkilere sahip olduğu için serbest radikallerin oksidatif stres oluşturabilecek konsantrasyonlara ulaşmadan antioksidanlar tarafından tamponlanması gerekmektedir. Çinko ve melatonin oldukça güçlü antioksidanlar olarak farklı deneysel iskemi-reperfüzyon çalışmalarında farklı doz ve sürelerde kullanılmıştır. Yaptığımız bu çalışmada ise çinko ve melatoninin ayrı ayrı ve beraber olarak 3 hafta süreli kullanımının sıçanlarda kas iskemi-reperfüzyonundaki potansiyel serbest radikal önleyici etkilerini araştırmayı amaçladık.

Yüksek lisansım süresince ve tez çalışmam sırasında her zaman desteğini ve katkısını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Rasim Moğulkoç'a ve Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Abdülkerim Kasım Baltacı hocama teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
ÖZET.....	v
SUMMARY	vi
1. GİRİŞ	1
1.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....	2
1.2. Kas İskemisi	4
1.3. Oksidan/Antioksidan Sistem	6
1.3.1. Glutasyon	8
1.3.2. Çinko ve Antioksidan Etkileri	10
1.3.3. Melatonin ve Antioksidan Etkileri.....	11
1.4. Malondialdehid.....	13
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	15
2.1. Deney Hayvanları.....	15
2.2. Kan ve Doku Alımı	16
2.3.Kan ve Doku Analizleri.....	17
2.3.1. Protein Tayini	17
2.3.2. Doku Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Belirlenmesi.....	18
2.3.3. Doku Glutasyon Analizi.....	18
2.3.4. Plazma Malondialdehid Seviyelerinin Belirlenmesi	18
2.3.5. Eritrosit Glutasyon Analizi	19
2.4. İstatistik	19
3. BULGULAR.....	20
4. TARTIŞMA	25
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	29
6. KAYNAKLAR	30
7.EKLER.....	38
8.ÖZGEÇMİŞ.....	39

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	Adenozin Difosfat
AMP	Adenozin Monofosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
Ca ⁺²	Kalsiyum
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ER	Endoplazmik Retikulum
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GSSG	Okside Glutasyon
GST	Glutasyon S Transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
İ/R	İskemi/Reperfüzyon
K ⁺	Potasyum
LOOH	Lipid Hidroperoksitleri
MDA	Malondialdehid
Na ⁺	Sodyum
NAD ⁺	Nikotin adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid Dinükleotid Fosfat
O ₂ ⁻	Süperoksit Radikali
OH ⁻	Hidroksil Radikali
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asidi
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SCN	Suprakiazmatik Nükleus
SOD	Süperoksit Dismutaz
SR	Sarkoplazmik Retikulum
Zn	Çinko

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sıçanlarda Kastaki İskemi-Reperfüzyon Hasarında Çinko ve Melatoninin Etkisi

Mehmet ÇELER

Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2016

İskemi, doku veya organı besleyen kan akımının yetersizliğine bağlı olarak ortaya çıkan geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre veya doku hasarına neden olmaktadır. Mevcut çalışmanın amacı sıçanlarda deneysel kas iskemi-reperfüzyon hasarında 3 hafta süreli çinko, melatonin ve çinko + melatonin takviyesinin doku ve plazmadaki malondialdehid (MDA) ile eritrosit ve dokudaki glutatyon (GSH) düzeyleri ve kas histolojine olan etkisini belirlemektir. Çalışma 38 adet erkek Wistar-albino türü sıçan üzerinde gerçekleştirildi.

Deney Grupları şu şekilde oluşturuldu. 1-Sham-kontrol grubu, 2-İskemi-Reperfüzyon (I/R), 3-Çinko + I/R, 4-Melatonin + I/R, 5-Çinko + Melatonin + I/R. I/R sol femoral arterin 1 saat iskemi ve 1 saat reperfüzyonuyla oluşturuldu. Çalışmanın bitiminde hayvanlardan alınan kan ve doku örneklerinde MDA ile doku GSH ve eritrosit GSH değerleri belirlendi.

I/R gruplarında MDA değerleri önemli şekilde arttı. Çinko ve melatonin uygulaması ise artan MDA düzeylerini azaltırken, GSH değerlerinde önemli artışa neden oldu. Kasta histolojik yönden değişim belirlenemedi.

Çalışmanın sonuçları kas dokusunda iskemi-reperfüzyona bağlı olarak artan lipid peroksidasyonun çinko ve melatonin uygulamasıyla önlenebildiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: GSH; Kas iskemi-reperfüzyonu; MDA; sıçan

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The effects of Zinc and Melatonin on Muscle Ischaemi-Reperfusion Damage in Rat

Mehmet ÇELER

Department of Physiology

MASTER THESIS / KONYA-2016

Ischaemia is lead to damage in cell or tissue damage due to insufficient blood flow stream in tissue or organ. The aim of present study was to determine the effect of zinc, melatonin and zinc + melatonin supplementation for 3 weeks on plasma and tissue MDA and erythrocyte and tissue levels and muscle histology. This study was performed on 38 male Wistar-Albino rats.

Experimets groups were designed as Sham-control, ischaemia-reperfusion (I/R), zinc + I/R, melatonin + I/R and zinc + melatonin + I/R. Ischaemia-reperfusion was induced by left femoral arter occlusion (1 hour) and reopening (1 hour). At the end of experiments blood and tissue samples were analysed for MDA and GSH.

MDA levels in I/R groups increased significantly. Zinc and melatonin supplementation reduced MDA, however increased GSH levels. There was obserwed no histological alteration in muscle.

The results of present study show that increased lipid peroxidation in muscle tissue may be prevented by zinc and melatonin supplementation.

Key Words: GSH; MDA; Muscle ischaemia-reperfusion; rat

1.GİRİŞ

Hipoksi aerobik oksidatif solunumu etkileyerek hücre hasarına ve hatta hücrenin ölümüne neden olabilmektedir. Hipoksinin en önemli nedeni ise, kan akımının bozukluğuna bağlı olarak organ ve dokunun yetersiz perfüzyonuna sebep olan iskemidir (Akkoç 2008). İskemi organ veya dokuyu besleyen kan akımının yetersizliği nedeniyle gelişen durumdur. Geri dönüşümlü veya dönüşümsüz doku ya da organ hasarına neden olur (Ayada ve ark 2015).

İskemi sonucu doku veya organların tekrar kanlanması ve oksijenlenmesine reperfüzyon; iskemi sonrasında yeniden kanlanma döneminde doku ya da organlarda oluşan hasar ise reperfüzyon hasarı olarak tanımlanır. Reperfüzyon hasarında birçok mekanizma etkili olmakla beraber en çok suçlanan hücre içine moleküler oksijenin girmesiyle hızla oluşan serbest radikal türevleridir (Granger ve Kvietys 2015, Shi ve Xue 2016). İskemik hasardan kurtarmak için ön koşul reperfüzyondur. Ancak paradoksal olarak reperfüzyon ile birlikte moleküler oksijenin yeniden girişi lipid peroksidasyonu ile ilişkilendirilen zararlı oksijen radikallerin kaynağını oluşturmakta ve hücre zarı bütünlüğünün bozulmasına sebep olmaktadır (Dillon ve ark 2006). İskemik dokulara reperfüzyonun sağlanması hücresel hasarın artmasına sebep olabilir (Ayada ve ark 2015).

Serbest radikaller kararsız yapıda, kısa ömürlü, son derece reaktif ve en dış yörüngesinde bir veya daha fazla çiftlenmemiş elektrona sahip moleküllerdir. Kararlı hale gelmek için diğer hücrelere saldırarak zarar verirler (Choudhari ve ark 2014, Naseem ve Parvez 2014). Reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species-ROS) ve reaktif nitrojen türleri (reactive nitrogen species-RNS) olarak sınıflandırılan serbest radikaller aerobik solunum, hücre metabolizması ve patojenlere karşı savunma sırasında devamlı olarak oluşmaktadır (Niedzielska ve ark 2016).

Normalde serbest radikaller ve antioksidan sistem bir denge halindedir. Serbest radikallerin artması veya antioksidanların azalması bu dengenin bozulmasına sebep olur. Serbest radikaller mevcut antioksidanların tamponlama kapasitesini aşarsa oksidatif stresin gelişmesine sebep olur. Bu radikaller protein, DNA, lipidler, karbonhidratlar dahil olmak üzere moleküllerin yapısını, fonksiyonlarını değiştirerek

organizmaya zarar verebilirler. Oksidatif stres hipertansiyon, diabet, iskemik hastalıklar, kalp damar hastalıkları, ateroskleroz, artrit, kanser, erken yaşlanma, alzheimer ve parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların patogeneğinde de önemli rol oynamaktadır (Sena ve Chandel 2012, Czerska ve ark 2015, Patel ve ark 2016, Ratliff ve ark 2016).

Oksidatif metabolizma süresince kullanılan oksijenin küçük bir kısmı yüksek derecede reaktif ve toksik etkili reaktif oksijen türlerine dönüşmektedir. Oluşan bu reaktif oksijen türleri sınırlı konsantrasyonlarda bazı hücresel fonksiyonlar için düzenleyici roller üstlenmektedir. Ama oluşan reaktif oksijen türleri olması gereken konsantrasyonları aştığı zaman hücre organellerine, membran lipidlerine, nükleer ve mitokondrial DNA ve proteinler gibi makromoleküllerin yapısına zarar verirler (Ghneim ve Alsheibly 2016).

Bu çalışmanın amacı sıçanlarda iskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarında üç hafta süreli çinko ve melatoninin ayrı ayrı ve beraber uygulamasının lipid peroksidasyonuna olan etkilerini belirlemektir.

1.1 İskemi - Reperfüzyon Hasarı

İskemi terimi ilk defa 19. yüzyılın başlarında arteriyel akışın bozulmasına bağlı olarak dokulara yeterli kan akımının olmadığını göstermek için kullanılmıştır. İskemi/Reperfüzyon (İ/R) ile karakterize edilen miyokardiyal enfarktüs, inme, periferik vasküler rahatsızlıklar ölümlerin en sık nedenleri arasındadır (Kalogeris ve ark 2012). İskemi, organ veya dokuyu perfüze eden kan dolaşımının eksikliğine bağlı olarak gelişen patolojik bir süreçtir. İskemi esnasında hücre veya dokunun ihtiyacı olan oksijen ve besin maddeleri karşılanamaz ve geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz hasar meydana gelir. Uzun süren iskemi, hücresel bütünlüğün bozulmasına ve sonrasında da hücrenin ölümüne sebep olabilir (Tiryakioğlu ve ark 2015, Topaloğlu ve ark 2015). Dokunun dayanabildiği ve hala canlılığını sürdürebildiği maksimum zaman aralığına kritik iskemi süresi denir. Kritik iskemi süresi dokudan dokuya ve sıcaklığa bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Hasarın büyüklüğü ve derecesi birçok etkene bağlı olmakla birlikte ana etken kritik iskemi

süresi ve doku tipidir. Örneğin İ/R'ye deri dokusu, kas dokusuna göre daha dayanıklıdır (Gillani ve ark 2012).

Hipoksiyle beraber mitokondride oksidatif fosforilasyon gerçekleşemediği için hücre içi adenosin trifosfat (ATP) seviyesi azalır ve hücre anaerobik glikolizi kullanarak enerji sağlamaya çalışır. İskemi esnasında hücrede mevcut bulunan ATP'nin yıkılmasıyla da sırasıyla adenosin difosfat (ADP), adenosin monofosfat (AMP), adenosin, inozin ve son olarak da hipoksantin açığa çıkar (Gillani ve ark 2012, Ferrari ve Andrade 2015). İskemiden etkilenmiş olan hücreler artık ATP sağlamak için anaerobik glikoliz yolu kullanmaya mecbur kalırlar. Bunun sonucu olarak laktat ve hidrojen birikimi olur ve hücre içi pH düşer. Düşen pH'yı dengeleyebilmek için hücre içinde artan hidrojen yükünü sodyum-hidrojen (Na^+/H^+) değiştiricisi ile Na^+ karşılığında H^+ hücre dışına atılır ama bununla birlikte hücre içine fazla sodyum alınmış olur. Hücre içi artan sodyum da sodyum-kalsiyum ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$) değiştiricisi ile Na^+ iyonlarına karşı, Ca^{+2} hücre içine girer. Bu durum sonunda hücre için kalsiyum konsantrasyonunda artış meydana gelir. İ/R sırasında endoplazmik/sarkoplazmik retikulum (ER/SR) Ca^{+2} deposu süreçten etkilenir. ER/SR içine Ca^{+2} geri alınamazken ER/SR den Ca^{+2} çıkışı da artar. Bütün bunlar hücre için toksik olan kalsiyum konsantrasyonunun daha fazla artmasına sebep olur (Kalogeris ve ark 2012). İskemi döneminde ayrıca ksantin dehidrojenaz, ksantin oksidaza dönüştürülür. Ksantin dehidrojenaz geri dönüşümlü olarak sülfidril gruplarının oksidasyonu ya da geri dönüşümsüz olarak sitozolde biriken kalsiyumun proteazları aktive etmesi suretiyle iki şekilde ksantin oksidaza dönüştürülebilir (Ferrari ve Andrade 2015).

İskemik olmayan hücrelerde hipoksantin, ksantin dehidrojenaz enzimi ile ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonun elektron alıcısı nikotinamid adenin dinükleotidin okside (NAD^+) formudur. Ama iskemi durumlarında ksantin dehidrojenaz, ksantin oksidaza dönüştüğü için ksantin oksidaz enzimi de elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanır ve reaktif oksijen türlerinden süperoksit radikalinin (O_2^-) oluşumuna sebep olur (Gillani ve ark 2012, Granger ve Kvietys 2015). Süperoksit radikali, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-) olmak üzere üç ana reaktif oksijen türü vardır. Moleküler oksijene bu şekilde elektron ilavesiyle reaktif oksijen türlerinden süperoksit radikali oluşur. Süperoksit radikali de diğer iki önemli reaktif türlerden olan hidrojen peroksit ve hidroksil

radikaline dönüşebilir (Di Dalmazi ve ark 2016, Di Meo ve ark 2016). Reaktif oksijen türlerinin üretiminde en önemli yeri mitokondride elektron taşıma zincirinden kaçan elektronlar oluşturmaktadır. Diğer önemli sebepler ise NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz gibi enzimlerdir (Kezic ve ark 2016).

1.2. Kas İskemisi

İskemiden sonra kan akımının tekrar sağlanmasıyla beraber dokuda İ/R hasarı gelişir. Reperfüzyon hücre ölümüne neden olan ve dokuda fonksiyon bozukluğu ve nekroz ile sonuçlanan akut inflamatuvar olayları tetikler. İskelet kaslarında I/R hasarı ciddi bir sorundur. Lokal hasarlardan başka kanın sirkülasyonu dahil başka sistemik sorunlara sebep olabilir. Genellikle travma, uzun turnike uygulamaları, transplantasyon gibi durumlarda görülür (Hori ve ark 2013). Turnike uygulamaları bazı ameliyatlara için klinikte kullanılmaktadır. Klinikte turnike uygulamasının üst sınırı 2 saattir. İskelet kaslarında 3 saati geçen iskemi durumlarında geriye dönüşsüz kas hasarı oluşabilmektedir (Rybalko ve ark 2015).

Ekstremitte iskemisinde dokunun hayatta kalabilmesi için vazgeçilemez ön koşul reperfüzyondur. Ancak reperfüzyonla tekrar oksijenin girişi paradoksal olarak doku hasarının artmasına sebep olur. İskemik doku bacak gibi büyük bir doku ise sadece lokal hasarla kalmayıp reperfüzyon ürünlerinin toksik etkileri uzak organları da etkileyebilir (Elmalı ve ark 2007). İskemi reperfüzyon yaralanmaları miyokard enfarktüsü, travma gibi hastalıklarda ya da turnike uygulamalarında ortaya çıkan ciddi bir durumdur. Mast hücreleri, nötrofiller, enflamatuvar sitokinler, nitrik oksit ve reaktif oksijen türleri, iskelet kasında oluşan hasarda önemli bir rol oynamaktadır. İki saatten uzun süren iskelet kası yaralanmaları geniş iskelet kas lifi ölümüne sebep olmaktadır (Vignaud ve ark 2010). Reaktif oksijen türleri ve aktive olmuş nötrofiller iskemi reperfüzyondan kaynaklanan hasarın başlıca sorumlusu olarak görülmüştür. Süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri iskelet kasında iskemi reperfüzyon hasarının temelini oluşturur. En yaygın kaynağı ksantin oksidaz ve aktive nötrofillerdir. Reaktif oksijen türlerinin üretiminde ksantin oksidaz enziminin büyük bir rolü vardır. İskemi olmayan normal zamanda iskelet kasının mikrovasküler endotelyumda bulunan ksantin dehidrojenaz enzimi iskemi süresince ksantin oksidaz enzimine dönüştürülür (Gillani et al 2012).

Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz fagositik hücrelerde keşfedilmiş bir enzimdir. Patojenleri etkisiz hale getirmek için fagositik kısımlarında süperoksit ve hidrojen peroksit serbest bırakırlar. Nötrofillerin plazma zarında bulunan NADPH oksidaz enzimi, iskemi sırasında hücre içine kalsiyum akışıyla birlikte aktive olur. Aktive olan enzim NADPH'yi NADP^{+} 'ye çevirirken reperfüzyonla sağlanan moleküler oksijeni de süperoksite indirger. Fizyolojik koşullarda en fazla bulunan radikal olan süperoksit radikali moleküler oksijene bir elektron ilavesiyle oluşur. Membran lipidlerine nüfus etme özelliğine sahip olmadığı için üretildiği yerde sınırlanır. Ani ve çok sayıda oluşan oksijen serbest radikalleri endotelial hasara neden olduğu gibi aktive nötrofiller endotele yapışarak da endotelin bozulmasına sebep olurlar. Nötrofillerin postiskemik dokulara toplanmasıyla beraber yüzeylerinde bulunan adezyon molekülleri aktive olur ve vasküler endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan reseptörle reaksiyona girerek bir kompleks yapı oluştururlar. Oluşan bu kompleks yapı sayesinde nötrofillerdeki oksidanlar kas hücrelerine geçerken endotel hasarıyla da mikrovasküler bariyeri bozarak iskemi sonrasında kaslarda kapiller düzeyde akımın olmamasına neden olur. Yani iskemi sonrası tekrar akım sağlansa bile hücre düzeyinde beslenme bozulur (Yağmurdur ve Başar 2007, Ferrari ve ark 2015, Di Dalmazi ve ark 2016, Ghneim ve ark 2016, Petrushanko ve ark 2016).

Kas dokusu iskemiye dayanıklı olduğu bilinmektedir ama tüm dokular gibi kas dokusu da iskemi sonucunda nekroze olabilir. Reperfüzyonla birlikte artan kan akımıyla beraber kas hücresine daha fazla kalsiyum girişi olur. Artan serbest radikal türleri lipid peroksidasyonuna sebep olarak sarkolemmmanın bütünlüğünün bozulmasına neden olur ve daha fazla kalsiyum hücre içine girer. Hücre içinde ATP bitince de kalsiyumu hücre dışına atan Ca-ATPaz pompası durur. Kalsiyum dışarı atılamadığı gibi sarkoplazmik retikuluma da sokulamaz. Sitoplazmadaki artan kalsiyum, kalsiyum bağımlı proteaz ve fosfolipazları aktifler. Bu enzimler mitokondrinin fonksiyonlarını bozarak ATP depolarının bozulmasına sebep olur. Ayrıca reperfüzyonla birlikte polimorf nüveli lökositler dokuya yayılır, kapiller damarların duvarına taşınarak dolaşımın bozulmasına sebep olur (Sever 2009).

1.3. Oksidan/Antioksidan Sistem

Oksijen memeliler için zorunlu olmasının yanı sıra toksik etkileride bulunmaktadır. Örneğin atmosferde bulunan azot veya oksijen, reaktif oksijen türlerinin ya da reaktif nitrojen türlerinin üretimine yol açabilir. Hücreler tarafından tüketilen oksijenin %1-2'si mitokondriyal solunum zincirinden kaçarak yüksek derece reaktif türlere dönüşür. Oluşan bu reaktif oksijen türleri hücre içi kalsiyum ve pH değişimlerini etkileyerek hücrede fonksiyonların bozulmasına, sonunda da hücre ölümüne sebep olabilir (Ye ve ark 2015, Ghneim ve ark 2016). Aerobik canlılarda reaktif oksijen türleri fizyolojik olarak da üretilmektedir. Antioksidan sistem bu oksidatif türlerin zararlı etkilerine karşı korur. Organizmada serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi bir denge halindedir. Serbest radikal üretimi ve buna karşılık antioksidan sistem arasındaki dengenin bozulmasına oksidatif stres denir (Cárdenas-Rodríguez ve ark 2014, Lalkovičová ve Danielisová 2016). Oluşan bu serbest radikaller DNA, lipidler, proteinler gibi biyomoleküllere zarar verirler. Bu biyomoleküllerin peroksidasyonu olduğu zaman mutajen ve kanserojen ürünler üretirler. Hücrede oluşan bu ürünleri enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi bileşenleri tarafından temizlenir (Sadati Zarrini ve ark 2016).

Orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunduran moleküller olan serbest radikaller hücre membranlarını, proteinleri, nükleik asitleri oksitlemeye çalışırlar (Torres-Cuevas ve ark 2015). Reaktif oksijen türleri hücre zarlarında uzun zincirli doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek özellikle malondialdehid (MDA) olmak üzere lipid peroksidasyon ürünlerini üretirler. Serbest radikallerin hücre membranındaki doymamış yağ asitlerine etki etmesi sonucu oluşan lipid peroksidasyonu membran geçirgenliğinin artmasına yol açarak hücrenin ölümüne sebep olabilir (Bar-Or ve ark 2015, Wang ve ark 2016).

Reaktif oksijen türleri olarak da ifade edilen serbest radikallerin üretimi çok sayıda moleküler ve enzimatik antioksidan tarafından dengelenmiştir. C, A, E vitaminleri, ürik asit, glutatyon (GSH), piknogenol, tioredoksin moleküler antioksidanlara; katalaz (CAT), tioredoksin redüktaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S transferazı (GST), askorbat peroksidaz,

askorbat redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ise enzimatik antioksidanlar olarak örneklendirilebilir (Di Dalmazi ve ark 2016).

Tüm aerobik organizmaların hücreleri kimyasal enerjilerinin çoğunu mitokondrilerinde oksijeni kullanmak suretiyle ürettikleri için mitokondri, hücre içi reaktif oksijen türlerinin ana kaynağıdır. Tüm reaktif oksijen türlerinin yaklaşık %90'ı mitokondride ATP üretimi sürecinde oluşmaktadır. Solunum zincirinden kaçan elektronlar moleküler oksijenle reaksiyona girerek süperoksit anyonu oluşur. En önemli reaktif oksijen türleri süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalidir (Di Dalmazi ve ark 2016, Nebbiso ve ark 2015).

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller, en fazla elektron transferi sonucu oluşurlar ancak oluşan bu radikaller her zaman tehlikeli kimyasal türler olarak düşünülmemelidir. Fizyolojik konsantrasyonlarda olan reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türleri önemli düzenleyici roller üstlenerek organizmada yararlı etkilere sahiptir. Bu konsantrasyondaki kontrol edilemeyen artışlar yüksek reaktivlik sebebiyle lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi biyomoleküllere zarar verme riskini artırır. Serbest radikaller makrofajlar ve nötrofiller tarafından da patojenleri yok etmek için de kullanılır (Ayyappan ve ark 2015, Niedzielska ve ark 2016). Canlı sistemler için birçok yararlı etkilere sahiptir. Fizyolojik süreçlerde önemli bir düzenleyici de oldukları için iki ayrı alanda da rol oynarlar. Kan basıncı regülasyonu, bağışıklık fonksiyonları, bilişsel fonksiyonlar, büyüme, apoptozis, enzimatik reaksiyonlar, sinyal iletim süreci gibi birçok alanda rol üstlenirler (Di Meo ve ark 2016, Vezzoli ve ark 2016). Fizyolojik konsantrasyonlarda bu kadar önemli rollere sahip olan serbest radikallerin hücresel düzeyde yüksek seviyelerde olması sitotoksik ve mutajeniktir. Ayrıca oksidatif strese sebep olurlar. Hemen hemen tüm ökaryotik hücrelerde üretilen reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri gerekli miktarı aşarsa biyomoleküllerle reaksiyona girerek moleküllerin yapısal ve işlevsel özelliklerini değiştirmek suretiyle dokunun işlevini kaybetmesine ve doku hasarına sebep olurlar. DNA'da bu hasar oldukça önemlidir, çünkü hücre ölümüne veya mutasyonlara yol açabilir (Sena ve Chandel 2012, Hausenloy ve Yellon 2013, Yu ve ark 2016).

Antioksidanlar ise oksidanlar olarak da adlandırılan serbest radikallere kolay bir elektron hedefi oluştururlar. Bu oksidanlara karşı uygun elektronun bağlanmasını sağlayarak stabil bir yapı oluşumunu sağlarlar. Oksidan ve antioksidan sistemin denge halinde olması hücree ve dokuların yapısal bütünlüğünün korunması ve normal fonksiyonlarının devamı için çok önemlidir. Oksidatif denge devam ettiği sürece organizma, oksidanlardan etkilenmemektedir (Aydemir ve Karadağ Sarı 2009, Erdem ve ark 2010). Antioksidanlar, hücre hasarını ve lipid peroksidasyonunu, peroksidasyon zincir reaksiyonunu baskılayarak ya da serbest radikalleri toplayarak engellemektedir (Sezer ve Keskin 2014).

1.3.1. Glutasyon

Glutasyon (GSH), glutamat, sistein ve glisinden olmak üzere üç aminoasitten oluşan bir antioksidandır. Suda çözünebilen düşük molekül ağırlıklı tiol tripeptiddir. Hücre içi redoks dengesinin sağlanması önemli bir rolü vardır. Hücrede indirgenmiş formda bulunur ve çeşitli fizyolojik görevleri vardır. İnsan fizyolojisinde en aktif antioksidan sistemlerden biridir (Sonthalia ve ark 2016, Yu ve Long 2016). GSH, reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türlerine karşı güçlü bir antioksidan etki göstererek oksidatif hasara karşı hücreyi ve biyomolekülleri korur (Singh ve ark 2016).

Glutasyonun indirgenmiş glutasyon (GSH) ve oksitlenmiş glutasyon (GSSG) olmak üzere birbirine dönüşebilen iki formu vardır. GSH sürekli glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ile GSSG'ye dönüştürölür. GSSG, glutasyon redüktaz (GR) enzimi tarafından GSH'a indirgenir (Sonthalia ve ark 2016).

GSH, antioksidan enzimlerden olan GSH-Px, GR, GST'nin aktivasyonuna katılır. Normalde yüksek oranlarda bulunmaktadır ve kofaktör gibi işlev görür. Glutasyon, GSH-Px enziminin kofaktörü gibi hareket ederek aktivasyonunu sağlar. GSH-Px, lipid peroksitlerini ve hidrojen peroksitleri detoksifiye ederken GSH okside olur ve hücreler için toksik olan okside GSH yani GSSG oluşur. GR enzimi oluşan toksik etkili GSSG'yi NADPH varlığında redükte glutasyon olan GSH'a indirgeyerek hücre içinde GSH değişiminin dengelenmesinde rol oynar. GST de ayrıca, GPx gibi lipid hidroperoksitleri azaltabilir ve lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan 4-

hidroksinonenal'i detoksifiye edebilmekedir (Quintana-Cabrera ve Bolanos 2013, Ayyappan ve ark 2015, Cárdenas-Rodríguez ve ark 2014, Müller 2015, Schmitt ve ark 2015).

GSH/GSSG oranı genellikle hücrenin antioksidatif bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Bu oranın hücrede optimum seviyede tutulması, hücre canlılığı için gereklidir. GSH hücre sitoplazmasında sentezlenir; mitokondri, peroksizom, endoplazmik retikulum ve çekirdeğe aktarılır. Birçok metabolik süreçte GSH konsantrasyonu azalma ve GSSG konsantrasyonu ise artma eğilimindedir. Hücre dengesinin sağlanması için indirgenmiş GSH'ın durumu çok önemlidir (Kalinina ve ark 2014, Schmitt ve ark 2015, Robaczewska ve ark 2016). GSH/GSSG oranı çok önemli olduğu için GSSG olmadığı durumlarda NADPH'nin hücre içi seviyesinin düşmesi GR'yi inaktive eder. Daha sonra oksidatif bir stres sonucu GSSG'nin hücre içi seviyesi artınca da GR tekrardan aktive olmaktadır (Akşit ve ark 2015).

Hücre içi ve hücreler arası bir antioksidan olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Glutatyon ortamdaki serbest radikallerle birleşerek antioksidan etki gösterir. Antioksidan sistemden başka proteinlerdeki sülfidril gruplarını redükte halde tutarak, protein ve enzimlerde oluşabilecek inaktivasyonu engeller. Ayrıca ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, protein ve DNA sentezi, aminoasit transportu, radikal yıkımı sonrası oluşan hidroperoksitlerin transportu ve bazı enzimatik reaksiyonlarda koenzim gibi görevleri vardır (Çelikezen ve Ertekin 2008, Ögüt ve ark 2011, Kahraman ve ark 2013).

Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan ürünler, GSH'ın kuvvetli antioksidan özelliği tarafından peroksidasyonun erken dönemlerinde zarda bulunan fosfolipitlerin doymamış yağ asitlerini koruyarak oksidatif stres oluşumunu önlemektedir. Serbest radikallerin temizlemesine direkt olarak etki eder. Serbest radikallerin ölçümü zor olduğu için GSH ölçümünün yapılması oksidatif stres ve antioksidan sistem hakkında bilgi verir. GSH Px ile birlikte enzimatik olarak da etki gösterir. GSH etkin olarak hücreyi koruyabilmesi için büyük kısmı redükte halde tutulmalıdır. GSH'ın yaklaşık % 40'ı safra ile atılır. Safradaki bu GSH diyetdeki ksenobiyotiklere karşı vücudu koruduğu, barsak lümenindeki lipit peroksidasyonu önlediği ve barsak

epitelyumunu oksijen radikallerine karşı koruduğu düşünülmektedir (Memişoğulları 2005, Çaylak 2011).

1.3.2. Çinko ve Antioksidan Etkileri

Çinko birçok proteinin stabilitesi için gereklidir. Çinko değişik biyolojik rollere sahip esansiyel bir elementir. Demir ve bakır gibi geçiş elementlerinin aksine, çinko iyonlarının redoks aktivitesi yoktur ve redoks reaksiyonlarında doğrudan rol oynamazlar. İnsan vücudu için esansiyel bir mineral olan çinko antiapoptoz, antienflamasyon, antioksidasyon gibi çeşitli biyolojik etkilere sahiptir (MacDiarmid ve ark 2016, Rice ve ark 2016).

Vücut, artmış oksidatif stresi ya doğal olarak ürettiği endojen antioksidanlarla ya da dışarıdan alınan gıda takviyesi ile üretilen eksojen antioksidanlarla nötralize eder. Antioksidanlar, serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hücreleri korurlar ve serbest radikal oluşumunu engellemeye çalışırlar. Önemli bir antioksidan olan süperoksit dismutazın (SOD) tam aktivitesi için bakır ve çinko gereklidir. Bakır, enzimin katalitik aktivitesi için gerekli iken çinko ise enzimlerin aktif bölgesine yapısal kararlılık kazandırır (Al-Naama ve ark 2015). Çinko özellikle SOD olmak üzere 300'den fazla enzimin kofaktörüdür. SOD, süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve oksijene çeviren enzimdir. Aynı zamanda serbest radikallerin nötralizasyonunu ve azaltılmasını da kolaylaştırır. NADPH oksidaz enzimini inhibe ederek de antioksidan etki göstermektedir. Glutasyon metabolizmasını ve metallotioneinin ifadesini düzenler (Cruz ve ark 2015, Ratliff ve ark 2016). Metallotioneinler dokuları serbest radikallerin zararlı etkilerinden korur. Yüksek metal ve sistein bulunan düşük molekül ağırlıklı ve metal bağlayıcı bir protein türüdür. Çinko metabolizmasıyla yakından ilişkilidir. Metallotionein, çinko iyon bağlayıcı protein aracılığıyla proteazlar ve transkripsiyon faktörlerinin faaliyetlerini sürdürülebilmesi için gerekli olan çinko iyonlarını sağlar. Çinko bağlayan metallotionein serbest radikalleri yok ederek çinko metabolizmasının düzenleyicisi olarak görev yapar (Kang ark 2015).

Çinko hücre membranlarının stabilizasyonunu sağlar ve hücre membranlarını serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasardan korur. Antioksidan enzimlerin

yapısına katılarak serbest radikal üretim zincirini kırar. Ayrıca çinkonun lipid peroksidasyonu inhibe edici antioksidan özelliği vardır (Kılıçalp ve ark 2008).

Vücutta birçok enzim çinko içermektedir. Yetişkin bir insanın vücudunda 2-3 gram çinko bulunmaktadır. Sağlıklı bir yaşam için düzenli olarak alınması gerekir. Diyetle tavsiye edilen günlük alım miktarı erkekler için 11 mg, kadınlar için ise 8 mg'dır. Emilim duodenum ve jejunumdan gerçekleşir. Emilim esnasında bakır ve çinko rekabete girer. Birinin az olması diğerinin emilimini artırır (Plum ve ark 2010, Grigorescu ve ark 2015).

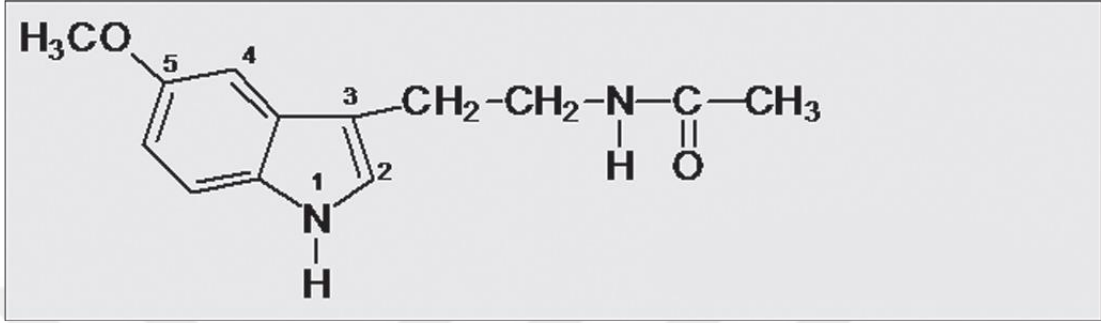
Çinko canlı organizmalarda demirden sonra en çok bulunan eser elementtir. Biyolojik sistemlerde sadece 2^+ değerlikli olarak bulunur. Fizyolojik şartlarda redoks aktivitesi yoktur. Çinko iyonları hidrofilik özellikte olduğu için hücre zarından pasif difüzyonla geçemez. Hücre zarından geçmesi için özel taşıyıcı sistemler vardır. Çinko fizyolojisi için çinko taşıma proteinleri çok önemlidir (Kambe ve ark 2015). Çinko konsantrasyonu azaldığında mitokondrial ve mikrozomal zarlarda lipid peroksidasyon arttığı, normal seviyede ise redoks dengesizliklerine karşı hücreyi koruduğu ve lipid peroksidasyonu önlediği görülmüştür (Borges de Araújo ve ark 2015).

1.3.3. Melatonin ve Antioksidan Etkileri

N-asetil 5-metoksi triptamin olarak ifade edilen melatonin ağırlıklı olarak epifiz bezinde olmakla beraber yumurtalık, testis, kemik iliği, bağırsak, plasenta ve karaciğer dahil olmak üzere pek çok organ tarafından üretilen güçlü bir antioksidandır (Esteban-Zubero ve ark 2016, Shiroma ve ark 2016). Bir nörohormon olan melatoninin %80'i epifiz bezinden salgılanmaktadır (Danilov ve Kurganova 2016). Melatoninin kimyasal yapısı Şekil 1 de gösterilmiştir (Şener 2010).

Melatonin hormonun salgılanması özel bir düzene bağlıdır. Karanlığın başlamasıyla artmaya başlayan melatonin, gecenin ortasında (02:00 ile 04:00 saatleri arası) zirve yapar ve gecenin ikinci yarısı yavaş yavaş düşmeye başlar (Chang ve Chiang 2016). Fotoreseptif organ olan retinadan gelen ışık bilgileri suprakiazmatik nükleus (SCN) vasıtasıyla pineal beze iletilir. Serotonin kaynaklı bir hormon olan

melatonin sentezlendikten sonra hemen dolaşıma verilir. Gece ve gündüz sentezinde farklılıklar olmakla beraber geceleyin daha fazla sentezlenir (Nishiwaki-Ohkawa ve Yoshimura 2016). Biyolojik etkilerini Melatonin reseptörü 1A (MTNR1A) ve Melatonin reseptörü 1B (MTNR1B) olmak üzere 2 transmembran reseptörü vasıtasıyla gösterirler (Yang ve ark 2015).



Şekil 1. Melatoninin kimyasal yapısı (Şener 2010)

Melatonin; sirkadyen ritm, uyku, bağışıklığın geliştirilmesi gibi çeşitli fizyolojik aktivitelere sahiptir. Ama melatoninin en önemli etkisi oksidatif strese karşı canlıları koruyan antioksidan etkisidir (Shahrokhi ve ark 2016). Melatonin molekülü birçok antioksidan maddenin aksine hem lipofilik hemde hidrofilik özelliğe sahiptir. Bu özelliği sayesinde kan beyin bariyeri dahil olmak üzere bütün biyolojik zarlardan geçebilir. Membranlar, sitoplazma, mitokondri, çekirdek gibi farklı hücre kısımlarında ulaşabilmektedir. Hızlı ve etkili bir antioksidandır. Serbest radikallere karşı doğrudan etkili olan melatonin süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi bazı enzimleri aktifleştirerek de dolaylı yoldan antioksidan etki gösterir (Munik ve Ekmekçioğlu 2015, Shiroma ve ark 2016).

Gündüz düşük seviyelerde olan melatonin salgısı gece olunca pik yapar. Melatonin omurgalıların kanında karanlıkta en üstün seviyeye ulaşmaktır. Melatoninin diğer antioksidanlardan ayıran diğer bir özelliğide kaskad reaksiyonuna sahip olmasıdır. Yani melatoninin ikincil ve üçüncül metabolitleri onun kaskad olarak adlandırılan çok sayıda toksik oksijen türevlerini nötralize edebiliyor olmasıdır. Bu sayede bir melatonin molekülü diğer antioksidanlara göre daha fazla serbest radikal temizleme kapasitesine sahiptir (Tan ve ark 2015).

Kanser, inflamasyon, yaşlanma, metabolik ve nörodejeneratif hastalıkları önlemede etkili olan melatonin, bazı serbest radikalleri temizleyerek direkt; bazı antioksidan enzimleri de aktifleştirerek dolaylı yoldan antioksidan etki göstermektedir (Bonnefont-Rousselot ve Collin 2010).

1.4.Malondialdehid

Malondialdehid (MDA) çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUHA) peroksidasyonu sonucu oluşan yüksek derecede reaktif ve toksik bir aldehittir. MDA birikimi zar geçirgenliğini değiştirebilir ve membran çift katlı lipid tabakasının akışkanlığını bozabilir. Lipid peroksidasyonun en mutajenik ürünlerinden olan MDA aynı zamanda lipid peroksidasyonun değerlendirilmesi için sık kullanılan bir biyomarkerdir (Erejuwa ve ark 2013). Vücudumuzda oksidatif belirteçler için lipid hidroperoksitler, 4-hidroksinoneal izoprostanlar, 8-hidroksi-2-deoksiguanosin, malondialdehid, allantoin, tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddeler öne sürülmüş ise de son yıllarda yapılan analizlerde en sık kullanılan belirteç malondialdehid olmuştur (Czerska ve ark 2015). İskemi-reperfüzyon hasarını lipid peroksidasyon aracılığıyla oluşan reaktif oksijen türlerinin gelişmesine dayandırılan süreci MDA gibi ürünler vasıtasıyla ölçebiliriz (Yakut ve ark 2008).

Lipid peroksidasyonu serbest radikal moleküllerinin hücrelerdeki fosfolipidlerin yapısında bulunan doymamış yağ asitleri ile etkileşimi sonucu ortaya çıkan bir dizi reaksiyondur ve geniş oksidasyon ürünlerini üretirler. Lipid peroksidasyonunun birincil ürünü lipid hidroperoksitlerdir (LOOH). İkincil ürün olarak ise malondialdehid (MDA), propanal, heksanal ve 4-hidroksinonenal sayılabilir. Lipid peroksidasyonunun en mutajenik ürünü ise MDA görülmüştür. Lipid peroksidasyonuna hücre membranında bulunan fosfolipidler çok duyarlıdır. Bu yüzden lipid peroksidasyonu en önemli hasarı hücre membranına verir. Lipid peroksidasyonu sonucunda hücre membranında yapısal ve fonksiyonel hasar oluşur ve bu hasar geri dönüşümsüzdür. Oluşan lipid peroksitler kolaylıkla yıkılarak başta MDA ve diğer yan ürünleri meydana getirirler. Bu nedenle MDA konsantrasyonundaki değişimler oksidatif stresin bir göstergesi kabul edilir (Ayala ve ark 2014, Bar-Or ve ark 2015, Sadati Zarrini ve ark 2016).

Lipid peroksidasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan MDA, hücre zarlarından kolayca geçerek hücre içindeki yapıları olumsuz yönde etkilemektedir. DNA bazlarıyla reaksiyona girerek mutajenik etki gösterir. Peroksidasyon sonucu oluşan MDA, hücre membran bileşiklerinin çapraz bağlanması ve polimerizasyona neden olarak iyon geçirgenliği, enzim aktivitesi, hücre yüzeyi ve membran özelliklerini değiştirir. Bu zellikler MDA'nın mutajenik, genotoksik ve karsinogenik olduğunu gösterir. Bu nedenle MDA lm hücresel hasarın derecesini ölçmede kullanılmaktadır. Lipid peroksidasyonla orantılı olarak MDA da artar (elikezen ve ertekin 2008, etin ve ark 2013, Sezer ve Keskin 2014).

Membran yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan MDA lipid peroksidasyonun en önemli göstergesidir. Lipid hidroperoksitlerin yıkımıyla oluşan MDA gibi sitotoksik aldehytler hücrede DNA ve proteinler gibi makro moleküllere zarar vererek hücrenin fonksiyonunu kaybetmesine neden olurlar. Dokularda lipid peroksidasyon oluşumu ve buna bağlı olarak MDA artışı hücrede geri dönüşümsüz membran hasarına, permeabilitenin artmasıyla da hücrelerde kalsiyum ve sodyum gibi elektrolit geçişlerinin hızlanması sonucu ATP kaybına, DNA hasarına ve hücre ölümlerine yol açabilir (Keleştemur 2010, Wang ve ark 2016).

2.GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Deney Hayvanları

Araştırma için öncelikle Necmettin Erbakan Üniversitesi Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden bu çalışma için Etik kurul onayı (Karar Sayısı: 2013-116) alındı. Daha sonra bahsedilen merkezden temin edilen sıçanlar üzerinde aynı yerde çalışma gerçekleştirildi. Araştırmada ortalama ağırlığı 300 g olan 38 adet erkek Wistar-albino türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar beş gruba ayrıldı. Bütün sıçanlara ısı ve ışık miktarları kontrol edilen odalarda su ve yemleri ad libitum olarak verildi.

Deney Grupları şu şekilde oluşturuldu.

1-Sham-kontrol grubu (n=6): Sıçanlar kas içi (i.m) olarak uygulanan ketamin hidroklorür (60 mg/kg) ve Xylasine (rompun) (5 mg/kg) ile anestezi edilip sol bacak bölgesi temizliği yapıldıktan sonra cerrahi olarak açıldı ve takiben hayvanların iskelet kas dokusu (gastrokinemius) ve kanları alındı.

2-İskemi-Reperfüzyon grubu (İ/R) (n=8): Genel anestezi yapılan hayvanlarda sol femoral arter 1 saat iskemi ve 1 saat reperfüzyona tabi tutulduktan sonra hayvanların ilgili doku ve kanları analiz için alındı.

3-Çinko + İskemi-Reperfüzyon (Zn+İ/R grubu (n=8): Bu gruptaki deney hayvanlarında öncelikli olarak 3 hafta süresince 3 mg/kg/gün dozunda periton içi çinko uygulanmak suretiyle takviye gerçekleştirildi, çinko takviyesinin bitiminde yukarıda belirtildiği şekilde iskelet kası iskemi-reperfüzyonu oluşturulmasını takiben ilgili doku ve kanları alındı.

4-Melatonin + İskemi-Reperfüzyon (Mel+İ/R grubu (n=8): Çalışmanın bu grubunda hayvanlara 3 hafta süresince 3 mg/kg/gün olarak periton içi melatonin takviyesi yapıldı, uygulamanın bitiminde femoral arterin iskemi-reperfüzyonu oluşturulmasını takiben öldürülen hayvanlardan iskelet kas dokusu ile kanları alındı.

5-Çinko + Melatonin + İskemi-Reperfüzyon (Zn+Mel+İ/R grubu (n=8): Deney hayvanlarına eşit dozlarda olmak üzere çinko ve melatoninin yukarıda belirtilen 3 haftalık takviyelerini takiben İ/R gerçekleştirildi, cerrahi uygulamanın bitiminde hayvanlardan kan ve iskelet kası dokuları alındı.



Resim 2.1. Sağ femoral arter klemplenmek suretiyle iskemi ve reperfüzyon sağlandı.

2.2. Kan ve Doku Alımı

Deneylerin bitiminde yüksek dozda anestezi ile öldürülen hayvanlardan 3-4 ml kadar kan EDTA'lı tüplere alındı. Alınan kan dokusunda eritrosit GSH analizi için serum fizyolojikle yıkanarak depolanırken elde edilen plazmalar ise MDA analizi için depolandı. Ayrıca hayvanlardan alınan iskelet kası doku örnekleri (gastrokinemius) MDA ve GSH tayini için analiz zamanına kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Ayrıca formaldehide konulan iskelet kası dokuları ise daha sonra histopatolojik olarak değerlendirildi.

2.3. Kan ve Doku Analizleri

2.3.1. Protein Tayini

Protein tayini biüret metoduyla yapıldı.

Analizi yapılacak olan doku tartıldıktan sonra tüplere konuldu ve 4°C’de Misonix’s Microscan ultrasonic doku parçalayıcısında 150 mM KCl’de %10’luk homejenat oluşacak şekilde parçalandı. Elde edilen homojenatlar 3000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj edildi. 50µl süpernatant üzerine 1ml sodyum sülfat ilave edilmesinin ardından 1ml biüret ayırıcı eklendi ve 5 dakika sonra, 50µl distile su, 1ml sodyum sülfat ve 1ml biüret ayırıcının ilave edilmesiyle hazırlanan köre karşı okutuldu.

Biüret Ayırıcı için 2,5g bakır sülfat, 10g sodyum potasyum tartarat bir miktar distile suda çözülüp üzerine 2.5N NaOH’dan 350 ml ilave edilip bu karışımı distile suyla 1lt’ye tamamlandı.

2.5N NaOH için 50g NaOH distile su ile 500ml’ye tamamlandı.

Sodyum Sülfat için 20g sodyum sülfat alınarak 100ml distile suyla seyreltildi.

Değerler g/dl olarak ifade edildi. Nmol/gram protein cinsinden aşağıda gösterildiği gibi hesaplandı.

HESABI: $A = a \times b \times c$

$$c = A / a \times b$$

$$c = [A / 1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \times 1 \text{ cm}] \times \text{dilüsyon faktörü}$$

$$c = (A / 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}) \times 17$$

$$c = A \times 108.9 \text{ nmol/mol şeklindedir.}$$

2.3.2. Doku Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Belirlenmesi

Doku MDA düzeyi Uchiyama ve Mihara (3) yöntemiyle gerçekleştirildi. Analizi yapılacak olan doku tartıldıktan sonra parçalara ayrılarak tüplere konuldu ve 4°C’de Misonix’s Microscan ultrasonic doku parçalayıcısında 150 mM KCl’de %10’luk homojenat oluşacak şekilde parçalandı. Homojenize dokudan 2 ml alınarak üzerine sırasıyla, 2 ml %8’lik HClO₄’ye konularak 3000 devirde 15 dakika santrifüj edildi. 0,5 ml süpernatant’a 3ml %1’lik H₃PO₄ ve 1 ml % 0,675’lik TBA ilave edilerek 90°C’lik su banyosunda 45 dakika inkübasyon yapıldı. Karışımın soğutulmasından sonra, üzerlerine 4 ml n-bütanol ilave edildi ve n-bütanole karşı 532 nm’de absorbansı okundu. Konsantrasyon c=108.9A olarak sağlandı. Sonuç mg/g protein olarak tanımlandı (Uchiyama ve Mihara, 1978).

2.3.3. Doku Glutasyon Analizi

GSH düzeylerini belirlemek için MDA’da tanımlandığı gibi doku 4°C’de 150 mM KCl’de %10’luk homojenat oluşacak şekilde homojenize edilerek, 3000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Örneklerin GSH miktarları Ellman’s metoduyla ölçüldü. 200µl süpernatant için, 8 ml fosfat buffer (pH 6,8), 78 ml 1 N NaOH ve 100µl Ellman’s solüsyonu ilave edilerek 5 dakika bekletildikten sonra spektrofotometre cihazında 412 nm’de distile suya karşı absorbansları okundu. Aktivite $a=(A_{\text{standard}}/A_{\text{örnek}}) \times C_{\text{standard}}$ olarak hesaplandı. Burada $c_{\text{standard}}=15.36$ g/dl olarak verildi. Doku proteini Biüret metoduyla elde edilerek değerler nmol/g protein olarak hesaplandı (Eldmann 1959).

2.3.4. Plazma Malondialdehid Seviyelerinin Belirlenmesi

EDTA’lı tüpe alınan kan örnekleri 3000 rpm’de 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve sonrasında plazmaları ayrıldı. Bir deney tüpüne 2,5 ml %10’luk TCA (trichloroessigaure krist., Merck katalog no: 818 K02907810) üzerine 0,5 ml plazma numunesi alındı. Vortekslenip tüplerin ağızları kapatıldı. 90°C’lik su banyosunda 15 dakika inkübasyon uygulandı. Soğuk su altında soğutulup spektrofotometrede 532 nm’de, köre karşı absorbansları okundu. Sonuçlar nmol/ml olarak verildi.

Kör, deney başlangıcından itibaren kör tüpüne plazma yerine aynı miktarda distile su konulup aynı işlemlerin yapılmasıyla hazırlandı.

2.3.5. Eritrosit Glutasyon Analizi

Eritrosit GSH ölçmek amacıyla EDTA'lı tüplere alınan kan numuneleri 3000 rpm'de 5 dak santrifij edildi. Sonrasında plazmaları ayrıldı. Eritrosit numunelerimiz 3 kez %0,9'luk serum fizyolojikle yıkandı. Elde edilen yıkanmış eritrosit numunelerinden 50µl alındı ve üzerlerine sırasıyla 450µl distile su, %10'luk sülfosalisilik asitten 500µl ilave edildi. Karışımın 1 saat buzda soğutulmasından sonra, 4000 devirde 3 dakika santrifüj edildi. Sonra süpernatantın 200µl'si alınarak üzerine sırasıyla, pH'ı 6,8 olan fosfat buffer'den 8 ml, 1 N NaOH'dan 78 µl ve Ellman solüsyonunun 100µl ilave edildi. 5 dakika sonra spektrofotometre cihazında 412nm'de reagent tüpünde distile suya karşı absorbansları okundu. Ellman solüsyonu 100 mg 5'-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic asitin (DTNB; Sigma, katalog no. D-8130) fosfat bufferin pH 7,8, 100 ml'sinde çözündürülmesiyle hazırlandı. GSH standardı 15.34mg/100 ml olarak ve 15.34 mg indirgenmiş glutatyonun (Sigma, katalog no: G-4251) 1 nm sodyum EDTA'nın 100 ml'sinde çözündürülmesiyle hazırlandı (Atroschi ve Sandholm, 1981). Sonuçlar mg/dl olarak verildi.

2.4. İstatistik

İstatistik analiz SPSS istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama±standard sapma olarak tanımlandı. Gruplar arası karşılaştırma için Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı ve p<0.05 seviyesi için Mann-Whitney U-testi uygulandı. P<0.05 seviyesi istatistik olarak önemli kabul edildi.

3. BULGULAR

Deney gruplarına ait doku GSH değerleri incelendiğinde bu parametrenin sham grubunda 0.15 ± 0.06 ; İ/R grubunda 0.12 ± 0.04 ; Zn+ İ/R grubunda 0.26 ± 0.04 ; Mel + İ/R grubunda 0.24 ± 0.15 ve Zn + Mel + İ/R grubunda ise 0.23 ± 0.01 olduğu belirlendi. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında İ/R + Zn ve melatonin uygulanan gruplar en yüksek doku GSH değerlerine sahipti ($P < 0.01$). İ/R grubu ise gruplar içerisinde en düşük doku GSH seviyelerine sahipti. Doku MDA seviyeleri incelendiğinde en yüksek MDA'nın iskemi-reperfüzyon grubunda olduğu belirlendi ($P < 0.001$). Diğer gruplar arasında MDA yönünden bir farklılık yoktu. Grupların MDA değerleri ise sırasıyla 0.12 ± 0.06 ; 0.49 ± 0.31 ; 0.09 ± 0.03 ; 0.13 ± 0.07 ; 0.12 ± 0.07 şeklindeydi.

Eritrosit GSH değerlerinin sham grubunda 0.24 ± 0.06 ; iskemi-reperfüzyon grubunda 0.12 ± 0.06 ; çinko + iskemi-reperfüzyon grubunda 0.23 ± 0.04 ; melatonin + iskemi-reperfüzyon grubunda 0.19 ± 0.05 ; çinko + melatonin + iskemi-reperfüzyon grubunda ise 0.27 ± 0.04 olduğu tespit edildi. Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında 5. Grup olan Zn + Mel + İ/R grubunun en yüksek eritrosit GSH değerine sahip olduğu görüldü ($P < 0.001$). İ/R grubu ise en düşük eritrosit GSH düzeyine sahipti. Zn + İ/R ve Mel + İ/R gruplarının ise iskemi-reperfüzyon grubundan daha yüksek eritrosit GSH düzeylerine sahip olduğu tespit edildi ($P < 0.001$). Plazma MDA değerleri incelendiğinde bu parametrenin sham grubunda 0.09 ± 0.01 ; iskemi-reperfüzyon grubunda 0.29 ± 0.12 ; çinko + iskemi reperfüzyon grubunda 0.06 ± 0.02 ; melatonin + iskemi-reperfüzyon grubunda 0.09 ± 0.03 ve Zn + Mel + İ/R grubunda ise 0.11 ± 0.06 olduğu belirlendi. Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında iskemi-reperfüzyon grubunda (grup 2) en yüksek plazma MDA değeri tespit edildi ($P < 0.05$). Diğer gruplar arasında plazma MDA'sı açısından önemli istatistik farklılık tespit edilemedi.

Çalışmada ayrıca iskemi-reperfüzyona maruz bırakılan kas dokusundaki histolojik değişimler de incelendi. Ancak gruplar arasında yapısal olarak önemli değişimlerin bulunmadığı belirlendi.

Çizelge 3.1: Çalışma Gruplarının Doku GSH ve MDA Değerleri.

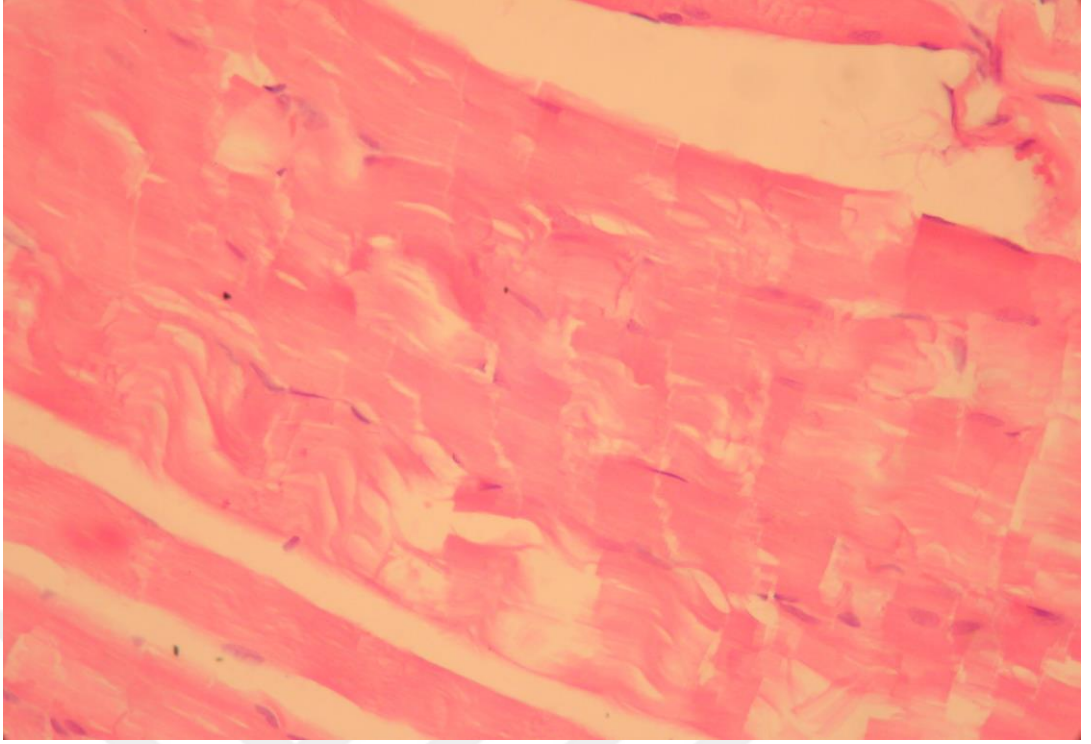
Gruplar	GSH (nmol/g protein)	MDA (mg/g protein)
Sham-Kontrol grubu (n=6)	0.15±0.06 b	0.12±0.06 b
İskemi-reperfüzyon grubu (İ/R) (n=8)	0.12±0.04 b	0.49±0.31 a
Çinko+ İ/R grubu (n=8)	0.26±0.04 a	0.09±0.03 b
Melatonin + İ/R grubu (n=8)	0.24±0.15 a	0.13±0.07 b
Zn+Melatonin + İ/R grubu (n=8)	0.23±0.01 a	0.12±0.07 b

*Aynı sütundaki farklı harfler istatistik olarak önemlidir. (GSH için P<0.05; MDA için P<0.001).

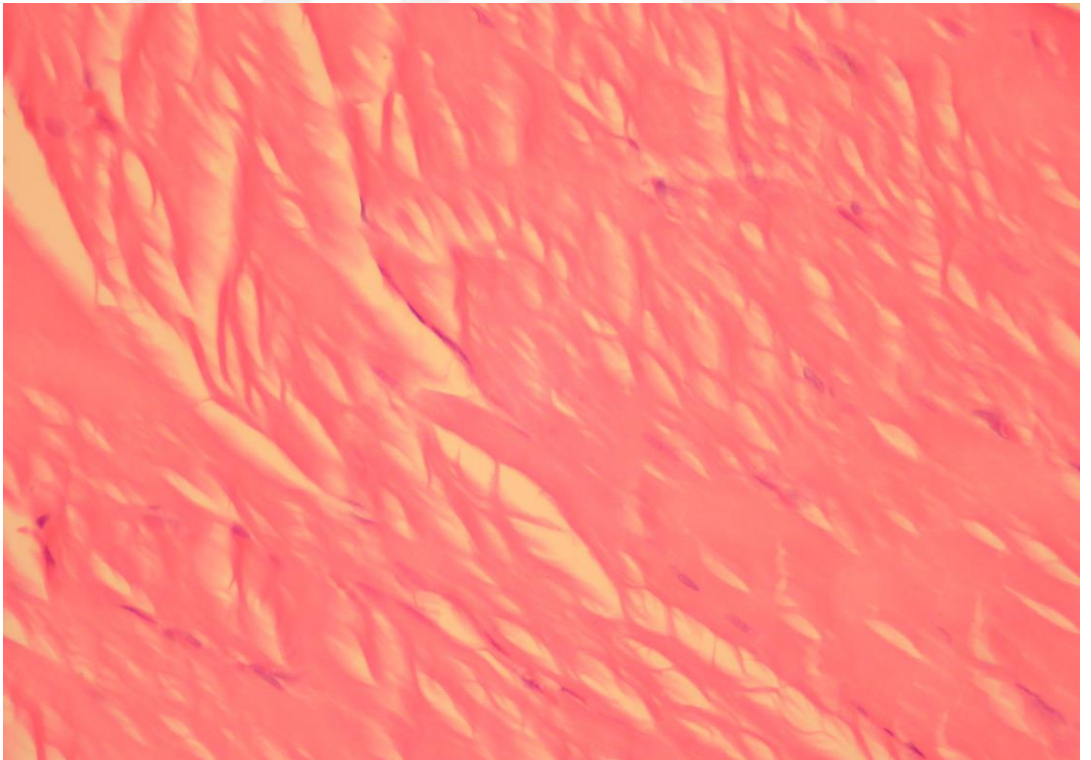
Çizelge 3.2. Çalışma Eritrosit GSH ve Plazma MDA Değerleri.

Gruplar	Eritrosit GSH (mg/dl)	Plazma MDA (nmol/ml)
Sham-Kontrol grubu (n=6)	0.24±0.06 b	0.09±0.01 b
İskemi-reperfüzyon grubu (İ/R) (n=8)	0.12±0.06 c	0.29±0.12 a
Çinko + İ/R grubu (n=8)	0.23±0.04 b	0.06±0.02 b
Melatonin + İ/R grubu (n=8)	0.19±0.05 b	0.09±0.03 b
Zn + Melatonin + İ/R grubu (n=8)	0.27±0.04 a	0.11±0.06 b

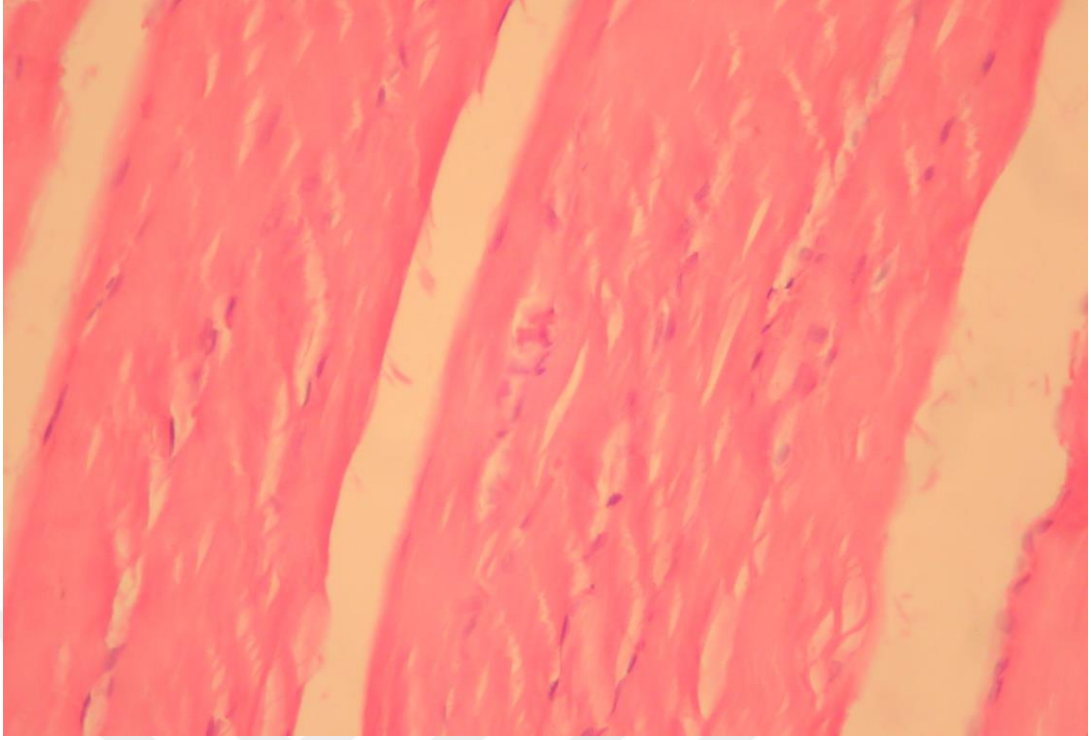
*Aynı sütundaki farklı harfler istatistik olarak önemlidir (GSH için P<0.001; MDA için P<0.05).



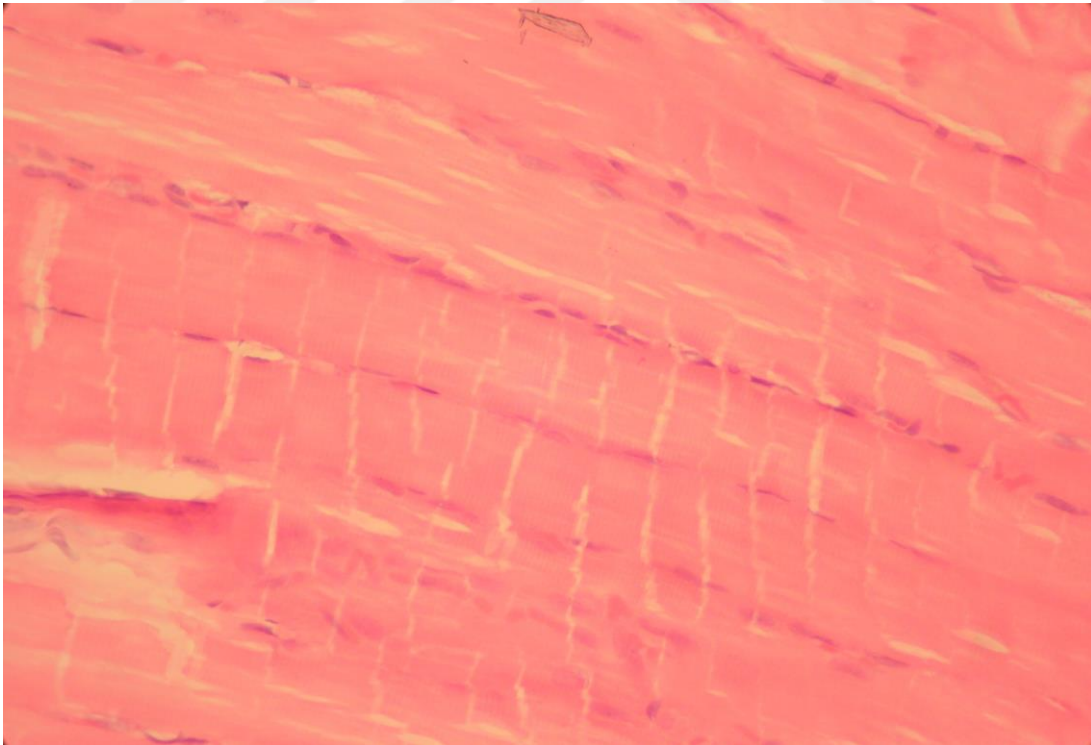
Resim 3.1.Sham Grubu x100; HxE



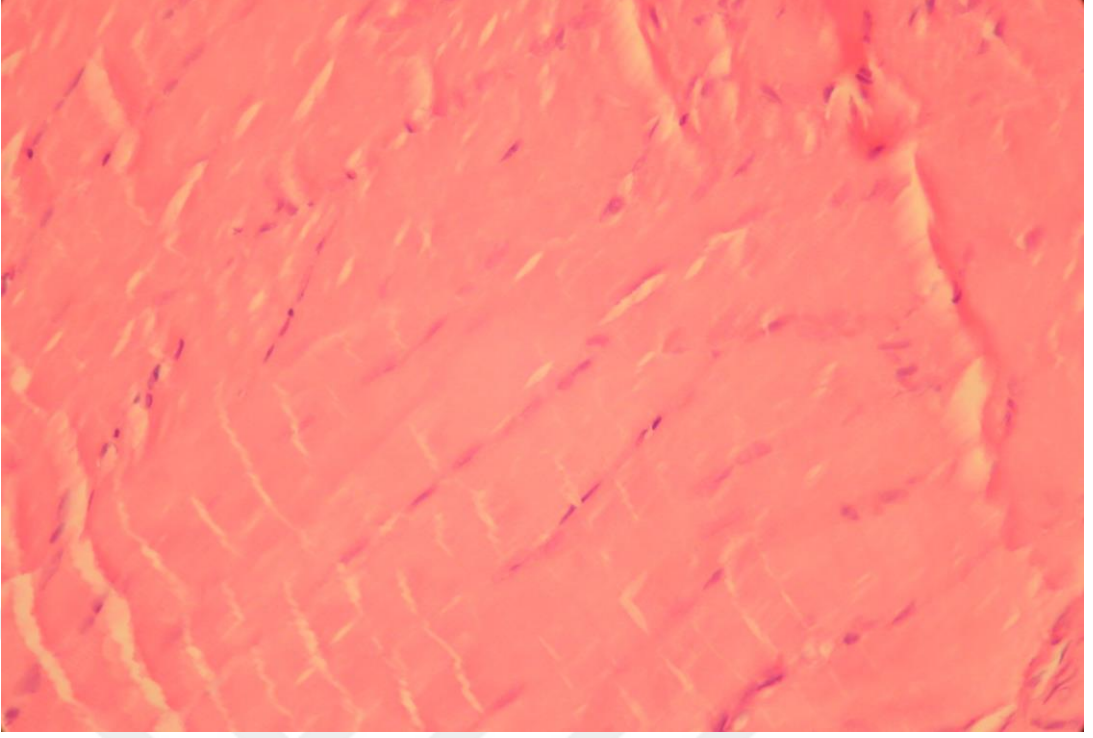
Resim 3.2.İskemi-Reperfüzyon Grubu x100; HxE



Resim 3.3.Çinko + İskemi-Reperfüzyon Grubu x100; HxE



Resim 3.4.Melatonin + İskemi-Reperfüzyon Grubu



Resim 3.5.Çinko + Melatonin + İskemi-Reperfüzyon Grubu

4. TARTIŞMA

Erkek sıçanlar üzerinde yapılmış olup bu çalışma sıçanların iskelet kaslarında deneysel olarak oluşturulan iskemi ve bunu takiben reperfüzyon oluşturulmuştur. Özellikle doku ve plazmadaki MDA artışı iskemi-reperfüzyona bağlı olarak oluşan hasarın göstergesi olarak değerlendirilebileceğinden dolayı, iskemi-reperfüzyonun gerçekleştiğini göstermektedir.

İskemi-reperfüzyon hayvanlarda ciddi doku oksidatif hasarına yol açabilir (Ghaly ve Marsh 2010, Tong ve ark 2012). İskelet kası yaralanması önemli şekilde ödem oluşturmak suretiyle akut ekstremite kompartman sendromuna da yol açabilir (Walters ve ark 2011). Oksidatif stres ve doku hasarının bir göstergesi olarak en sık kullanılan parametrelerden bir tanesi de MDA seviyelerinin belirlenmesidir. Bu amaçla bizim çalışmamızda MDA düzeyleri hem kas dokusunda hem de plazmada belirlenmiştir. Daha önceden Avcı ve ark (2014) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada sıçanlarda intrarenal abdominal aortanın 120 dakikalık iskemi-reperfüzyonu şeklinde oluşturulan model de I/R grubunun artmış MDA değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Gurji ve ark (2014) tarafından yapılan bir araştırmada da keçilerde arka bacağın turnike ile femoral arterin 90 dakika klemplenmesiyle oluşturulan iskemisi ve 4 saatlik reperfüzyonu neticesinde hasarın arttığı belirlenmiştir. Yine Kirişçi ve ark (2013)'ün çalışmasında sıçanlardaki iskelet kasındaki iskemi-reperfüzyonda (120 dakikalık iskemi-reperfüzyon) dokuda MDA düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir. Yine Tong ve ark (2012) kas iskemi-reperfüzyonunda artan MDA seviyelerini belirlemişlerdir. Bizim araştırmamızda da 1 saatlik iskemi ve takiben 1 saatlik reperfüzyona bağlı olarak gastrokinemius kas dokusunda doku hasarının göstergesi olarak MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre önemli artışlar belirlenmiş olması yukarıda belirtilen raporlarla benzerlik göstermektedir. Ancak iskemi-reperfüzyon öncesi 3 hafta süreli çinko ve melatonin uygulamasının (gerek ayrı ayrı ve gerekse kombine olarak) hem dokuda hem de plazmada artan MDA seviyelerini çok önemli düzeyde baskılayarak kontrol düzeylerine ve hatta çinko uygulanan grupta kontrol düzeyinden daha aşağılara çekmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda hem çinkonun hem de melatonin iskemi reperfüzyona bağlı olarak ortaya çıkan MDA artışlarını baskılamış olması elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir (Mahbooba ve Siddiquib 2002, Baltacı ve ark

2004, Nair ve ark 2005, Ahmadiasl ve ark 2013, Ahmadiasl ve ark 2014). Nitekim daha önceden gerçekleştirilen bazı çalışmalarda çinko takviyesinin iskemi-reperfüzyona bağlı olarak ortaya çıkan lipid peroksidasyon artışını baskıladığının rapor edilmesi çinko desteğinin önemini ortaya koymaktadır (Lin ve ark 2011, Kansal ve ark 2015, Zeng ve Tan 2015). İskemi-reperfüzyonda melatonin tedavisinin etkisinin araştırıldığı çalışmalarda da bu uygulamanın organ hasarını azalttığı belirlenmiştir. Erdem ve ark'nın (2010) çalışmasında femoral arterin klemplenmesiyle oluşturulan iskelet kası iskemi-reperfüzyon yaralanmasında 2 saat iskemi ve takiben 1.5 saatlik reperfüzyon sonucu MDA düzeylerinin önemli bir şekilde arttığı ancak melatonin tedavisi ise İ/R bağlı olarak artan MDA düzeylerini baskılamıştır. Wang ve ark (2011)'nın araştırmasında ise iskemiden 10 dakika önce ve reperfüzyondan 10 dakika sonra damar içi verilen melatoninin iskemi-reperfüzyonla oluşan mitokondriyal fonksiyon bozukluğunu önemli şekilde düzelttiği belirlenmiştir. Bizim araştırmamızda ise çinko ve melatonin kronik olarak değerlendirilebilecek şekilde 3 hafta süreyle periton içi yolla uygulandıktan sonra iskelet kasında iskemi-reperfüzyon oluşturularak organ ve sistemik hasarın göstergesi olarak kas dokusu ve plazma MDA seviyelerindeki değişimler incelenmiştir. Araştırmamız da yukarıdakilere benzer şekilde öncelikle hasarın göstergesi olarak MDA değerleri iskemi-reperfüzyona bağlı olarak hem doku düzeyinde hem de plazma da önemli şekilde artmış olması yukarıda bahsedilen araştırmalarla benzerlik göstermektedir. Ancak 3 hafta süreli çinko ve melatonin takviyesi ise MDA artışını hem doku hemde plazmada önemli şekilde baskılamış olması bu iki maddenin kas dokusu ve plazmada hasarı önleyici etkisini ortaya koymuştur. Bu bulgulara daha önce elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir (Mayo ve ark 2003, Ishii ve ark 2009, Sanchez-Hidalgo ve ark 2009, Farías ve ark. 2012).

Araştırmada antioksidan sistemin göstergesi olarak da glutatyon seviyeleri belirlendi. Bu parametre hem eritrositlerde hem de iskemi-reperfüzyon gerçekleştirilen kas dokusunda incelendi. Öncelikle kas dokusundaki GSH düzeyleri değerlendirildiğinde bu parametrenin İ/R grubunda en düşük olduğu görüldü. Benzer şekilde eritrosit GSH değerleri de İ/R grubunda diğer gruplardan daha düşük olarak tespit edildi. Çinko ve melatonin takviyesi ise hem ayrı ayrı hem de kombine olarak doku GSH seviyelerinde önemli artışlara yol açtı. Eritrosit GSH değerleri ise

kombine uygulamanın yapıldığı 5. Grupta en yüksek olarak belirlendi. Daha önce yapılan çalışmalarda kas iskemi reperfüzyonunda farklı çinko preparatları kullanılmıştır. Nitekim Atahan ve ark'ın (2010) sıçanlardaki çalışmasında çinko aspartat uygulamasının uzun süreli kas iskemi-reperfüzyonundaki etkisini incelemiş (3 saat iskemi-24 saat reperfüzyon) ve bahsedilen çinko preparatının uygulamasının GSH seviyelerini artırdığını rapor etmişlerdir. Türüt ve ark (2009) ise çinko aspartatın akciğer yaralanmasında glutatyon peroksidaz değerlerini artırarak koruyucu etki oluşturduğunu belirlemişlerdir. Başka bir araştırmada da yine çinko aspartat takviyesinin iskelet kasında glutatyon düzeylerini artırmak suretiyle koruyucu etki sağladığı belirlenmiştir (Atahan ve ark 2007). Bülbüloğlu ve ark'ın (2011) çalışmasında ise 50 mg/kg dozda uygulanan çinkonun glutatyon peroksidazı artırmak suretiyle incebağırsak dokusunda oksidan hasara karşı koruyuculuk sağladığı ortaya konulmuştur. Yılmaz ve ark (2015) çalışmasında ise mevcut araştırmadaki gibi uzun süreli çinko sülfat uygulamasının böbrek dokusunda GSH miktarlarını artırarak lipid peroksidasyonu baskıladığı rapor edilmiştir. Bizim gerçekleştirdiğimiz araştırmada ise iskemi-reperfüzyon öncesi 3 hafta süreli çinko sülfat (3 mg/kg/gün) olarak uygulandı ve hem kas dokusunda hem de eritrositlerde GSH seviyelerini artırmak suretiyle gerçekleştirdiğimiz deneysel modelde oksidan hasara karşı koruyuculuk sağladığı belirlendi. Araştırmada ayrıca melatoninde çinko gibi 3 hafta süreli uygulanması kas dokusu ve eritrositlerdeki GSH seviyelerinde önemli artışlara neden oldu. Melatonin oldukça güçlü bir antioksidandır ve farklı iskemi-reperfüzyon çalışmalarında bu antioksidan etkisi ortaya konulmuştur. Nitekim Yılmaz ve ark'nın çalışmasında (2015) böbrek dokusunu iskemi-reperfüzyonla oluşan oksidatif strese karşı koruduğu belirlenmiştir. Melatoninin bu etkisini Liu ve ark (2014) kalp dokusunda, Deng ve ark (2012) karaciğer, Aydemir ve ark (2016) spinal kord yaralanmasında GSH seviyelerini artırmak suretiyle sağladığı rapor edilmiştir. Araştırmamızda elde ettiğimiz melatonin uygulamasıyla artan GSH seviyeleri yukarıda bahsedilen araştırmalarla desteklenmektedir. Ancak burada vurgulanması gereken önemli bir bulgu eritrosit GSH düzeylerinin 5. grupta (çinko + melatonin) en yüksek seviyede bulunmuş olmasıdır. Dolayısıyla eritrosit GSH değerlerinin artırılmasında kombine uygulamanın ayrı ayrı uygulamalara göre daha fazla bir etki göstermiş olmasıdır.

Araştırmada ayrıca iskemi-reperfüzyon gerçekleştirilen kas dokusu histopatlojik yönden de değerlendirildi. Bu değerlendirmede histopatolojik yönden önemli bir değişim saptanamadı. Daha önceden yapılan kas iskemi-reperfüzyon çalışmalarında Hori ve ark (2013) bir buçuk saat süreli ve takiben 24-72 saat süreli reperfüzyona bağlı olarak kas dokusunda yapısal bozulmalar (ödem) tespit etmişlerdir. Walters ve ark'ın (2011) alışmasında ise 180 dakika iskemi ve 240 dakika reperfüzyona bağlı olarak ciddi kas ödemi belirlemişlerdir. Gerçekleştirdiğimiz araştırmada ise bahsedilen araştırmalara göre daha kısa süreli iskemi reperfüzyon (1+1) gerçekleştirilmiştir. Bu sürenin kısalığından dolayı kasta yapısal olarak bozulmaların meydana gelmediği söylenebilir. Dolayısıyla iskelet kas yapısında elde edilen farklı bulgular iskemi-reperfüzyonun süresiyle açıklanabilir.

5.SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmanın sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde sıçanlarda gastrokinemius kas dokusunda femoral arterin klemplenmesi ve tekrar kanlanmanın sağlanmasıyla oluşturulan 1 saat iskemi ve 1 saatlik reperfüzyonun gerek ilgili dokuda gerekse plazmada oksidan hasarın göstergelerinden birisi olan MDA seviyelerini önemli şekilde artırdığı belirlenmiştir. Ancak bahsedilen iskemi-reperfüzyon modeli öncesi 3 hafta süreli çinko sülfat ve/veya melatoninin 3 mg/kg/gün olarak ayrı ayrı veya beraber uygulamasının antioksidanlardan olan GSH seviyelerini önemli şekilde artırmak suretiyle dokuda ve kanda koruyuculuk sağladığı ortaya konulmuştur. Kas dokusunda bahsedilen deneysel modelde hasar oluşmadığı görülmüştür.

Araştırmanın bulgularına göre potansiyel olarak kasta oluşabilecek iskemi-reperfüzyona karşı önceden çinko ve melatoninin ayrı ayrı veya kombine olarak uygulanmasının doku hasarına karşı koruma sağlayabileceği söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Ahmadiasl N, Banaei S, Alihemati A, Baradaran B, Azimian E, 2014. Effect of a combined treatment with erythropoietin and melatonin on renal ischemia reperfusion injury in male rats. *Clin Exp Nephrol*, 18, 855-64
- Ahmadiasl N, Banaei S, Alihemmati A, 2013. Combination antioxidant effect of erythropoietin and melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Iran J Basic Med Sci*, 16, 1209-16.
- Akkoç H, 2008. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Dicle Tıp Dergisi*, 35, 211-215.
- Akşit H, Akşit D, Bildik A, Kara H, Yavuz Ö, Seyrek K, 2015. Deneysel karaciğer intoksikasyonunda N-asetil sistein'in glutatyon metabolizması ve lipid peroksidasyonuna etkileri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 62, 1-5.
- Al-Naama LM, Hassan MK, Mehdi JK, 2015. Association of erythrocytes antioxidant enzymes and their cofactors with markers of oxidative stress in patients with sickle cell anemia. *Qatar Med J*.
- Atahan E, Ergun Y, Belge Kurutas E, Cetinus E, Guney Ergun U, 2007. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle is attenuated by zinc aspartate. *J Surg Res*, 137, 109-16.
- Atahan E, Ergün Y, Kurutaş EB, Alici T, 2010. Protective effect of zinc aspartate on long-term ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Biol Trace Elem Res*, 137, 206-15.
- Avci T, Erer D, Kucuk A, Oztürk Y, Tosun M, Oktar GL, Arslan M, Iriz E, Kavutcu M, Tatar T, 2014. The effects of iloprost on ischemia-reperfusion injury in skeletal muscles in a rodent model. *J Surg Res*, 187, 162-8.
- Ayada C, Toru Ü, Genç O, Akcılar R, Şahin S, 2015. Balanced oxidative status by nesfatin-1 in intestinal ischemia-reperfusion. *Int J Clin Exp Med*, 8, 3318-3324.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S, 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*.
- Aydemir B, Karadağ Sarı E, 2009. Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. *Kocatepe Vet J*, 2, 56-60.
- Aydemir S, Dogan D, Kocak A, Dilsiz N, 2016. The effect of melatonin on spinal cord after ischemia in rats. *Spinal Cord*, 54, 360-3.
- Ayyappan S, Philip S, Bharathy N, Ramesh V, Kumar CN, Swathi S, Kumar AA, 2015. Antioxidant status in neonatal jaundice before and after phototherapy. *J Pharm Bioallied Sci*, 7, 16–21.
- Baltacı AK, Sunar F, Mogulkoc R, Oztekin E, 2004. Effect of zinc deficiency and supplementation on lipid peroxidation of renal tissue in overiectomized rats. *Biol Trace Elem Res*, 101, 231-9.
- Bar-Or D, Bar-Or R, Rael LT, Brody EN, 2015. Oxidative stress in severe acute illness. *Redox Biol*, 4, 340-345.
- Bonnefont-Rousselot D, Collin F, 2010. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, 278, 55-67.

- Borges de Araújo CG, Oliveira do Nascimento Holanda A, de Souza Rocha CV, Soares do Nascimento AP, Simplicio Revoredo CM, Borges da Silva B, do Nascimento Nogueira N, do Nascimento Marreiro D, 2015. Relationship Between Zincemia, Süperoxide Dismutase Activity and Marker of Oxidative Strees in Women With Breast Cancer. *Nutr Hosp*, 32, 785-791.
- Bulbuloglu E, Yildiz H, Senoglu N, Coskuner I, Yuzbasioglu MF, Kilinc M, Dogan Z, Deniz C, Oksuz H, Kantarçeken B, Atli Y, 2011. Protective effects of zinc, pentoxifylline, and N-acetylcysteine in an animal model of laparoscopy-induced ischemia/reperfusion injury of the small intestine. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*, 21, 947-51.
- Cárdenas-Rodríguez N, Coballase-Urrutia E, Pérez-Cruz C, Montesinos-Correa H, Rivera-Espinosa L, Sampieri A, Carmona-Aparicio L, 2014. Relevance of the Glutathione System in Temporal Lobe Epilepsy: Evidence in Human and Experimental Models. *Oxid Med Cell Longev*.
- Chang YS, Chiang BL, 2016. Mechanism of Sleep Disturbance in Children with Atopic Dermatitis and the Role of the Circadian Rhythm and Melatonin. *Int J Mol Sci*.
- Choudhari SK, Chaudhary M, Gadbail AR, Sharma A, Tekade S, 2014. Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: a review. *Oral Oncol*, 50, 10-8.
- Cruz KJC, De Oliveira ARS, Marreiro DDN, 2015. Antioxidant role of zinc in diabetes mellitus. *World J Diabetes*, 6, 333–337.
- Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wąsowicz W, 2015. Today's oxidative stress markers. *Med Pr*, 66, 393-405.
- Çaylak E, 2011. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9, 73-83.
- Çelikezen FÇ, Ertekin A, 2008. Ratlarda Akciğer Fibrozisinde Lipid Peroksidasyonu (MDA), Antioksidan Madde (Glutasyon, Seruloplazmin) ve Bazı Antioksidan Vitamin (B-Karoten, Retinol) Düzeylerinin İncelenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19, 17-20.
- Çetin İ, Muhtaroglu S, Barlak Ketı D, Hatipoğlu N, Kurtoğlu S, 2013. Obez Çocuklarda Malondialdehit Seviyesi ve paraoksonaz 1 Aktivitesinin Değerlendirilmesi. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 22, 64-69.
- Danilov A, Kurganova J, 2016. Melatonin in Chronic Pain Syndromes. *Pain Ther*, 5, 1-17.
- Deng J, Liu W, Wang Y, Dong M, Zheng M, Liu J, 2012. Polydatin modulates Ca(2+) handling, excitation-contraction coupling and β-adrenergic signaling in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 53, 646-56.
- Di Dalmazi G, Hirshberg J, Lyle D, Freij JB, Caturegli P, 2016. Reactive oxygen species in organ-specific autoimmunity. *Auto Immun Highlights*.
- Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM, 2016. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev*.
- Dillon JP, Laing AJ, Chandler JR, Wang JH, McGuinness A, Redmond HP, 2006. *Acta Orthop*, 77, 27-32.

- Elmali N, Esenkaya I, Karadağ N, Taş F, Elmali N, 2007. Effects of resveratrol on skeletal muscle in ischemia-reperfusion injury, 13, 274-280.
- Erdem M, Bostan B, Güneş T, Özkan F, Sen C, Özyurt H, Köseoğlu RD, Erdoğan H, 2010. Protective effects of melatonin on ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle. *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi*, 21, 166-71.
- Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS, 2013. Evidence in support of potential applications of lipid peroxidation products in cancer treatment. *Oxid Med Cell Longev*.
- Esteban-Zubero E, García-Gil FA, López-Pingarrón L, Alatorre-Jiménez MA, Iñigo-Gil P, Tan DX, García JJ, Reiter RJ, 2016. Potential benefits of melatonin in organ transplantation: a review. *J Endocrinol*, 229, 129-46.
- Farias JG, Zepeda AB, Calaf GM, 2012. Melatonin Protects the Heart, Lungs and Kidneys from Oxidative Stress under Intermittent Hypobaric Hypoxia in Rats. *Biol Res*, 45, 81-5.
- Ferrari RS ve Andrade CF, 2015. Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev*.
- Ghaly A, Marsh DR, 2010. Ischaemia-reperfusion modulates inflammation and fibrosis of skeletal muscle after contusion injury. *Int J Exp Pathol* Ischaemia-reperfusion modulates inflammation and fibrosis of skeletal muscle after contusion injury, 91, 244-55.
- Ghneim HK, Al-Sheikh YA, Alshebly MM, Aboul-Soud MA, 2016. Superoxide dismutase activity and gene expression levels in Saudi women with recurrent miscarriage. *Mol Med Rep*, 13, 2606-2612.
- Ghneim HK, Alshebly MM, 2016. Biochemical Markers of Oxidative Stress in Saudi Women with Recurrent Miscarriage. *J Korean Med Sci*, 31, 98-105.
- Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ, 2012. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury*, 43, 670-675.
- Granger DN, Kvietys PR, 2015. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*, 6, 524-51.
- Grigorescu R, Gruia MI, Nacea V, Nitu C, 2015. Parameters of oxidative stress variation depending on the concentration of inorganic zinc compounds. *J Med Life*, 8, 449-451.
- Gurji HA, White DW, Hoxha B, Sun J, Harbor JP, Schulz DR, Williams AG Jr, Olivencia-Yurvati AH, Mallet RT, 2014. Pyruvate-enriched resuscitation: metabolic support of post-ischemic hindlimb muscle in hypovolemic goats. *Exp Biol Med* (Maywood), 239, 240-9.
- Hausenloy DJ, Yellon DM, 2013. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*, 123, 92-100.
- Hori K, Tsujii M, Iino T, Satonaka H, Uemura T, Akeda K, Hasegawa M, Uchida A, Sudo A, 2013. Protective effect of edaravone for tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury on skeletal muscle in murine hindlimb. *BMC Musculoskelet Disord*.

- Ishii H, Sato S, Yin C, Sakuma Y, Kato M, 2009. Cetrorelix, a gonadotropin-releasing hormone antagonist, induces the expression of melatonin receptor 1a in the gonadotropin-releasing hormone neuronal cell line GT1-7. *Neuroendocrinology*, 90, 251-9.
- Kahraman T, Üstün R, Bayıroğlu F, Aslan R, 2013. Gıda Kısıtlamasının Ratlarda Doku Lipid Peroksidasyonu ve Glutasyon Düzeylerine Etkilerinin Araştırılması. *Kocatepe Vet J*, 6, 19-24.
- Kalinina EV, Chernov NN, Novichkova MD, 2014. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Mosc)*, 79, 1562-83.
- Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ, 2012. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*, 298, 229-317.
- Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N, 2015. The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev*, 95, 749-84.
- Kang M, Zhao L, Ren M, Deng M, Li C, 2015. Reduced metallothionein expression induced by Zinc deficiency results in apoptosis in hepatic stellate cell line LX-2. *Int J Clin Exp Med*, 8, 20603-20609.
- Kansal SK, Jyoti U, Sharma S, Kaura A, Deshmukh R, Goyal S, 2015. Effect of zinc supplements in the attenuated cardioprotective effect of ischemic preconditioning in hyperlipidemic rat heart. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 388, 635-41.
- Keleştemur GT, Keleştemur Ü, Selçuk S, 2010. Nakil İşleminin Gökkuşluğu Alabalığı, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) Yavrularının Malondialdehit Düzeyine Etkisi. *Sakarya Üniv Fen Bilimleri Dergisi*, 14, 119-123.
- Kezic A, Spasojevic I, Lezaic V, Bajcetic M, 2016. Mitochondria-Targeted Antioxidants: Future Perspectives in Kidney Ischemia Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev*.
- Kılıçalp D, Yur F, Değer Y, 2008. Elektromanyetik Radyasyona Maruz Bırakılan Kobayların Serum Bakır ve Çinko Seviyelerine Yeşil Çayın Etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniv Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19, 53-56.
- Kirisci M, Oktar GL, Ozogul C, Oyar EO, Akyol SN, Demirtas CY, Arslan M, 2013. Effects of adrenomedullin and vascular endothelial growth factor on ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle in rats. *J Surg Res*, 185, 56-63.
- Lalkovičová M, Danielisová V, 2016. Neuroprotection and antioxidants. *Neural Regen Res*, 11, 865–874.
- Lin CL, Tseng HC, Chen RF, Chen WP, Su MJ, Fang KM, Wu ML, 2011. Intracellular zinc release-activated ERK-dependent GSK-3 β -p53 and Noxa-Mcl-1 signaling are both involved in cardiac ischemic-reperfusion injury. *Cell Death Differ*, 18, 1651-63.
- Liu LF, Qin Q, Qian ZH, Shi M, Deng QC, Zhu WP, Zhang H, Tao XM, Liu Y, 2014. Protective effects of melatonin on ischemia-reperfusion induced myocardial damage and hemodynamic recovery in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18, 3681-6.
- MacDiarmid CW, Taggart J, Jeong J, Kerdsonboon K, Eide DJ, 2016. Activation of the yeast UBI4 polyubiquitin gene by Zap1 via an intragenic promoter is critical for zinc-deficient growth. *J Biol Chem*.

- Mahbooba M, Siddiqui MKJ, 2002. Long-term effects of a novel phosphorothionate (RPRII) on detoxifying enzymes in brain, lung and kidney rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53, 355–60.
- Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Lopez-Burillo S, Reiter RJ, 2003. Oxidative damage to catalase induced by peroxyl radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free Radic Res*, 37, 543–53.
- Memişoğulları R, 2005. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30-39.
- Munik MS, Ekmekçioğlu C, 2015. Prooxidant effects of melatonin: a brief review. *Turk J Biol*, 39, 832-839.
- Müller S, 2015. Role and Regulation of Glutathione Metabolism in *Plasmodium falciparum*. *Molecules*, 20, 10511-34.
- Nair N, Bedwal S, Prasad S, Saini MR, Bedwal RS, 2005. Short term zinc deficiency in diet induces increased oxidative stress in testes and epididymes of rats. *Indian J Exp Biol*, 43, 786-94.
- Naseem M, Parvez S, 2014. Role of Melatonin in Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury. *ScientificWorld Journal*.
- Nebbioso M, Scarsella G, Librando A, Pescosolido N, 2015. Biomolecular Modulation of Neurodegenerative Events during Ageing. *Oxid Med Cell Longev*.
- Niedzielska E, Smaga I, Gawlik M, Moniczewski A, Stankowicz P, Pera J, Filip M, 2016. *Mol Neurobiol*, 53, 4094–4125.
- Nishiwaki-Ohkawa T, Yoshimura T, 2016. Molecular basis for regulating seasonal reproduction in vertebrates. *J Endocrinol*, 229, 117-27.
- Öğüt S, Polat M, Alanoğlu EG, 2011. Kan bağışçılarının kanlarındaki malondialdehit ve redükte glutatyon seviyeleri. *Süleyman Demirel Üniv. Tıp Fak Derg*, 18, 128-131.
- Patel JB, Shah FD, Joshi GM, Patel PS, 2016. Clinical significance of inflammatory mediators in the pathogenesis of oral cancer. *J Cancer Res Ther*, 12, 447-57.
- Petrushanko IY, Lobachev VM, Kononikhin AS, Makarov AA, Devred F, Kovacic H, Kubatiev AA, Tsvetkov PO, 2016. Oxidation of Ca^{2+} -Binding Domain of NADPH Oxidase 5 (NOX5): Toward Understanding the Mechanism of Inactivation of NOX5 by ROS. *Plos One*.
- Plum LM, Rink L, Haase H, 2010. The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health. *Int J Environ Res Public Health*, 7, 1342–1365.
- Quintana-Cabrera R, Bolaños JP, 2013. Glutathione and γ -glutamylcysteine in the antioxidant and survival functions of mitochondria. *Biochem Soc Trans*, 41, 106-10.
- Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS, 2016. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid Redox Signal*, 25, 119-46.

- Rice JM, Zweifach A, Lynes MA, 2016. Metallothionein regulates intracellular zinc signaling during CD4⁺ T cell activation. *BMC Immunol*.
- Robaczewska J, Kedziora-Kornatowska K, Kozakiewicz M, Zary-Sikorska E, Pawluk H, Pawlitzak W, Kedziora J, 2016. Role of glutathione metabolism and glutathione-related antioxidant defense systems in hypertension. *J Physiol Pharmacol*, 67, 331-7.
- Rybalko V, Hsieh PL, Merscham-Banda M, Suggs LJ, Farrar RP, 2015. The Development of Macrophage-Mediated Cell Therapy to Improve Skeletal Muscle Function after Injury. *PLoS One*.
- Sadati Zarrini A, Moslemi D, Parsian H, Vessal M, Mosapour A, Shirkhani Kelagari Z, 2016. The status of antioxidants, malondialdehyde and some trace elements in serum of patients with breast cancer. *Caspian J Intern Med*, 7, 31-36.
- Sanchez-Hidalgo M, De la Lastra CA, Carrascosa-Salmoral MP, Naranjo MC, Gomez-Corvere A, Caballero B, Guerrero JM, 2009. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol*, 44, 328-34.
- Schmitt B, Vicenzi M, Garrel C, Denis FM, 2015. Effects of N-acetylcysteine, oral glutathione (GSH) and a novel sublingual form of GSH on oxidative stress markers: A comparative crossover study. *Redox Biol*, 6, 198-205.
- Sena LA, Chandel NS, 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*, 48, 158-67.
- Sever L, 2009. Ezilme Sendromu. *Türk Ped Arş*, 44, 43-7.
- Sezer K, Keskin M, 2014. Serbest Oksijen Radikallerinin Hastalıkların Patogenezisindeki Rolü. *Fırat Üniv Sağlık Bilimleri Vet. Derg*, 28, 49 - 56.
- Shahrokhi N, Khaksari M, Nourizad S, Shahrokhi N, Soltani Z, Gholamhosseinian A, 2016. Protective effects of an interaction between vagus nerve and melatonin on gastric ischemia/reperfusion: the role of oxidative stress. *Iran J Basic Med Sci*, 19, 72-9.
- Shi S, Xue F, 2016. Current Antioxidant Treatments in Organ Transplantation. *Oxid Med Cell Longev*.
- Shiroma ME, Botelho NM, Damous LL, Baracat EC, Soares-Jr JM, 2016. Melatonin influence in ovary transplantation: systematic review. *J Ovarian Res*.
- Singh P, Kesharwani RK, Misra K, Rizvi SI, 2016. Modulation of Erythrocyte Plasma Membrane Redox System Activity by Curcumin. *Biochem Res Int*.
- Sonthalia S, Daulatabad D, Sarkar R, 2016. Glutathione as a skin whitening agent: Facts, myths, evidence and controversies. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 82, 262-72.
- Şener G, 2010. Karanlığın Hormonu: Melatonin. *Marmara Eczacılık Dergisi*, 14, 112-120.
- Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ, 2015. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules*, 20, 18886-906.

- Tiryakioglu O, Erkoc K, Tunerir B, Uysal O, Altin HF, Gunes T, Aydin S, 2015. The effect of iloprost and N-acetylcysteine on skeletal muscle injury in an acute aortic ischemia-reperfusion model: an experimental study, *Biomed Res Int*.
- Tong Z, Yu F, Liu Z, Liang H, 2012. Influence of ShuJinHuoXue tablets on ischemia reperfusion injury of animals skeletal muscle. *Molecules*, 17, 8494-505.
- Topaloğlu N, Memi G, Kaner T, Deniz M, Şahin Ö, Güven M, Çoşar M, 2015. Does Glp-2 have a protective effect on cerebral ischemia/reperfusion model? *Turk J Med Sci*, 45, 467-73.
- Torres-Cuevas I, Cernada M, Nuñez A, Escobar J, Kuligowski J, Chafer-Pericas C, Vento M, 2016. Oxygen Supplementation to Stabilize Preterm Infants in the Fetal to Neonatal Transition: No Satisfactory Answer. *Front Pediatr*.
- Türüt H, Kurutas EB, Bulbuloglu E, Yasim A, Ozkaya M, Onder A, Imrek SS, 2009. Zinc aspartate alleviates lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res*, 151, 62-7.
- Vezzoli A, Dellanoce C, Mrakic-Spota S, Montorsi M, Moretti S, Tonini A, Pratali L, Accinni R, 2016. Oxidative Stress Assessment in Response to Ultraendurance Exercise: Thiols Redox Status and ROS Production according to Duration of a Competitive Race. *Oxid Med Cell Longev*.
- Vignaud A, Hourde C, Medja F, Agbulut O, Butler-Browne G, Ferry A, 2010. Impaired skeletal muscle repair after ischemia-reperfusion injury in mice. *J Biomed Biotechnol*.
- Walters TJ, Mase VJ Jr, Roe JL, Dubick MA, Christy RJ, 2011. Poloxamer-188 reduces muscular edema after tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury in rat. *J Trauma*, 70, 1192-7.
- Wang L, Shan Y, Chen L, Lin B, Xiong X, Lin L, Jin L, 2016. Colchicine protects rat skeletal muscle from ischemia/reperfusion injury by suppressing oxidative stress and inflammation. *Iran J Basic Med Sci*, 19, 670-675.
- Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Zhang X, Khiabani KT, Zamboni WA, 2011. Melatonin attenuates I/R-induced mitochondrial dysfunction in skeletal muscle. *J Surg Res*, 171, 108-113.
- Yağmurdur H, Başar H, 2007. Ekstremité Cerrahisinde Turnike Uygulamasına Bağlı İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Anestezik Yaklaşım. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği*, 6, 1-2.
- Yakut N, Yasa H, Bahriye Lafci B, Ortac R, Tulukoglu E, Aksun M, Ozbek C, Gurbuz A, 2008. The influence of levosimendan and iloprost on renal ischemia-reperfusion: an experimental study. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 7, 235-239.
- Yang P, Liu H, Lin J, Yang H, 2015. The Association of rs4753426 Polymorphism in the Melatonin Receptor 1B (MTNR1B) Gene and Susceptibility to Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pain Physician*, 18, 419-31.
- Ye ZW, Zhang J, Townsend DM, Tew KD, 2015. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 1850, 1607-1621.
- Yilmaz M, Mogulkoc R, Baltaci AK, 2015. Effect of three-week zinc and melatonin supplementation on the oxidant-antioxidant system in experimental renal ischemia-reperfusion in rats. *Acta Clin Croat*, 54, 395-401.

- Yu B, Meng F, Yang Y, Liu D, Shi K, 2016. NOX2 Antisense Attenuates Hypoxia-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Cardiomyocyte. *Int J Med Sci*, 3, 646-52.
- Yu X, Long YC, 2016. Crosstalk between cystine and glutathione is critical for the regulation of amino acid signaling pathways and ferroptosis. *Sci Rep*.
- Zeng X, Tan X, 2015. Epigallocatechin-3-gallate and zinc provide anti-apoptotic protection against hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 rat cardiac myoblast cells. *Mol Med Rep*, 12, 1850-6.



7. EKLER



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi
(KONÜDAM)



Karar Sayısı: 2013 – 116

Karar Tarihi: 27.06.2013

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D.'den Prof.Dr.Rasim MOĞULKOÇ ve Mehmet ÇELER tarafından sunulan **"Sıçanlarda Kastaki İskemi-Reperfüzyon Hasarında Çinko ve Melatoninin Etkisi"** başlıklı Tez Projesi 8 üyenin katılımı ile değerlendirildi.

Projede 5 grupta toplam 38 adet sıçan (Wistar Albino) kullanılacağı, sıçanların yüksek doz anestezi ile sakrifiye edileceği bildirilmiştir.

Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin Necmettin Erbakan Üniversitesi Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesinin 6ncı maddesinde belirtilen "Etik Kurallara Uygunluk Esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

Necmettin Erbakan Üniversitesi Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesinde "Başvuru Sahibinin Sorumlulukları" başlığı altında yer alan kurallar ve madde 6'da belirtilen "Hayvan Deneyleri ile İlgili Etik İlkeler" saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi İlkelerine Uyulduğuna", çalışmanın deneysel kısmını yapacak çalışmacının "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına" sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından **"Uygun"** olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Prof.Dr.K.Esra
NURULLAHOĞLU ATALIK
Başkan

Prof.Dr.Lema TAVLI
Üye

Prof.Dr.A.Saide ŞAHİN
Üye-Katılmadı

Prof.Dr.Selim
KUTLU
Üye

Doç.Dr.Mehmet GÜL
Üye

Doç.Dr.Tevfik
KÜÇÜKKARTALLAR
Üye-Katılmadı

Yrd.Doç.Dr.Mehmet
ERGIN
Üye

Dr.M.Metin
ŞENER
Üye

Vet.Hek.Alpaslan
ÖZKÜRKÇÜLER
Üye

Mustafa SİRİN
Üye

Adres:N.E.Ü.Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi, 42080-Meram/KONYA
Tel: (0332) 223 71 11, Faks: (0332) 223 71 24 e-posta: konudam@konya.edu.tr
Web Adresi: <http://www.konya.edu.tr/merkezler/konudam> Bilgi: 223 71 11

8. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Manisada doğdum. İlk ve orta öğrenimini Kırşehirde, liseyi Kayseride tamamladım. 2011 yılında Selçuk Üniv. Fen Fak. Biyoloji bölümünde lisans eğitimini tamamladım ve aynı yıl Selçuk Üniv. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisansa başladım. Halen Sakarya İl Halk Sağlığı Müdürlüğünde Biyolog olarak görev yapıyorum.

