



T. C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKUT YOĞUN EGZERSİZ YAPTIRILMIŞ ERKEK SIÇANLARDA BAZI  
YANGISAL BELİRTEÇLER VE KALP HASARI ÜZERİNE MELATONİNİN  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Kübra SAFİ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Metehan UZUN

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE 2019





T. C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKUT YOĞUN EGZERSİZ YAPTIRILMIŞ ERKEK SIÇANLARDA BAZI  
YANGISAL BELİRTEÇLER VE KALP HASARI ÜZERİNE MELATONİNİN  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

Kübra SAFİ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Metehan UZUN

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE 2019

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2017-1218 sayılı karar ile desteklenmiştir.

## TEZ ONAY FORMU

Kurum Adı : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Program Adı : Fizyoloji  
Programın Seviyesi :Yüksek Lisans (X) Doktora ( )  
Anabilim Dalı : Fizyoloji  
Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Kübra SAFİ  
Tez Başlığı : Akut Yoğun Egzersiz Yaptırılmış Erkek Sıçanlarda Bazı Yangısal Belirteçler ve Kalp Hasarı Üzerine Melatoninin Etkilerinin Araştırılması  
Sınav Yeri : Tıp Fakültesi  
Sınav Tarihi : 28.01.2019

Yukarıda tanıtımı yapılan tez, Tez Sınav Jürisi tarafından okunmuş, kapsam ve kalite yönünden başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Tez Sınav Jürisi

Danışman (Unvan ve Adı)	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Metehan UZUN	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	
<b>Sınav Jüri Üyeleri (Unvan ve Adları)</b>		
Prof. Dr. İsmail MERAL	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	
Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Avni EROĞLU	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	
Dr. Öğr. Üyesi Hakan TÜRKÖN	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	
Dr. Öğr. Üyesi R. Özlem ÖZTOPUZ	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	

Tez sınav jürisi tarafından başarılı olarak kabul edilen Yüksek Lisans/Doktora Tezi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

## THESIS APPROVAL FORM

Institute Name : Çanakkale Onsekiz Mart University Institute of Health Sciences

Programme Name : Physiology

Programme Level : Master of Science (X) Doctor of Philosophy ( )

Department : Physiology



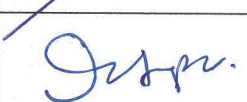
Student Name and Surname: Kübra SAFI

Title of the Thesis : Investigation of the effects of melatonin on some inflammatory markers and cardiac damage in male rats with acute intense exercise

Examination Place : Faculty of Medicine

Examination Date : 28/01/2019

We have investigated the present thesis in regard to content and quality and have approved as a Master of Science of Philosophy Thesis.

Supervisor (Title and Name)	Institution	Signature
Prof. Dr. Metehan UZUN	Çanakkale Onsekiz Mart University	
<b>Members of Examination Jury</b> (Titles and Names)		
Prof. Dr. İsmail MERAL	Bezmialem Vakif University	
Assist. Prof. Dr. Hüseyin Avni EROĞLU	Çanakkale Onsekiz Mart University	
Assist. Prof. Dr. Hakan TÜRKÖN	Çanakkale Onsekiz Mart University	
Assist. Prof. Dr. R. Özlem ÖZTOPUZ	Çanakkale Onsekiz Mart University	

The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Health Science Institute, Canakkale Onsekiz Mart University, with decision dated ..... and numbered .....

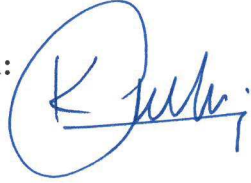
## BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlamasından yazımına hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8’de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

**Tarih:** 28/01/2019

**Tez Sahibi Adı Soyadı:** Kübra SAFİ

**İmza:**



## ÖZET

Akut yoğun egzersizin kalp hastalıkları açısından bir risk taşıdığı bilinmektedir. Melatonin pineal bezden salgılanan ve kalp için koruyucu etkisi olan bir hormon olup yoksunluğunda kalp damar sistemi olumsuz etkilenmektedir. Bu çalışma ile melatonin yoksunluğu veya ilavesinin akut yoğun egzersiz sonrası bazı yangısel ve kardiyak parametreler üzerine olan etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

Bu amaçla çalışmada gruplara pinealektomi operasyonu (PLT), içme suyuna melatonin katılması (0.3 mg/kg) ve egzersizden önce melatonin uygulaması (10 mg/kg i.p.) işlemleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma kullanılan 35 adet erkek Wistar Albino cinsi sıçandan 5 grup (SHAM, SHAM+MLT30, PLT, PLT+MLT30, PLT+MLT) oluşturulmuştur. Çalışmanın 7. gününde tüm gruplara akut yoğun egzersiz uygulanmış kan ve kalp dokusun örnekleri alınmıştır. Kan örneklerinden kortikosteron, cTnI, CK-MB, PCT, IMA, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  düzeyleri ile sol ventrikül dokusundan ise kaspaz-3 ve TLR-4 gen ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

Lökosit, TNF- $\alpha$ , PCT, CK-MB ve IMA düzeylerinin PLT yapılan gruplarda yüksek olduğu görülmüştür. Kortikosteron ve NF- $\kappa$ B düzeyleri ise MEL uygulanan gruplarda düşük bulunmuştur. TLR-4 ve kaspaz-3 gen ekspresyon düzeylerinde ise anlamlı değişiklikler belirlenmemiştir.

Sonuç olarak pineal melatonin yoksunluğu oluşturulan gruplarda yoğun egzersiz sonrası yangısel belirteçlerdeki artışın daha yüksek olduğu ve melatoninin verilmesinin bu parametrelerdeki bozulmayı düzelttiği anlaşılmıştır. Dolayısı ile melatonin yoksunluğuna maruz kalan bireylerin akut yoğun egzersize bağlı olumsuz yan etkilere diğer insanlara göre daha duyarlı olabilecekleri düşünülebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Melatonin, inflamasyon, kalp, apoptozis, IMA, akut yoğun egzersiz.

## ABSTRACT

Acute intense exercise is known to be a risk for heart disease. Melatonin is a hormone that is secreted from the pineal gland and has a protective effect on the heart. The aim of this study is to investigate the effect of melatonin withdrawal or addition on some inflammatory and cardiac parameters after acute intensive exercise.

For this purpose, pinealectomy operation (PLT), melatonin addition to drinking water (0.3 mg / kg) and melatonin administration before exercise (10 mg / kg i.p.) were performed. The study group consisted of 35 male Wistar Albino rats (SHAM, SHAM + MLT30, PLT, PLT + MLT30, PLT + MLT). On the 7th day of the study, blood and heart tissue samples were taken to all groups. Blood expression levels of corticosterone, cTnI, CK-MB, PCT, IMA, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  and caspase-3 and TLR-4 gene expression levels were determined from left ventricular tissue.

Leukocyte, TNF- $\alpha$ , PCT, CK-MB and IMA levels were high in PLT operated groups. Corticosteron and NF- $\kappa$ B levels were low in MLT treated groups. cTnI was found to be low in PLT groups. There was no change in TLR-4 and caspaz-3 gene expression levels.

As a result, it was found that the increase in inflammatory markers after intensive exercise in pineal melatonin deprivation groups was higher and melatonin administration improved the deterioration in these parameters. Therefore, individuals exposed to melatonin withdrawal may be considered to be more sensitive to adverse side effects due to acute intense exercise than to other people.

**Key words:** Melatonin, inflammation, heart, apoptosis, IMA, acute exhaustive exercise.



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her alanda ilgi ve desteğini gördüğüm, tezimin hazırlanmasında, deneysel çalışmam süresince göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı değerli hocam, bana ışık olup örnek aldığım kişi olan Prof. Dr. Metehan UZUN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime katkı sağlayan Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Mustafa EDREMİTLİOĞLU'na teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince benden yardımlarını esirgemeyen ve istatistiksel analizlerin yapılmasında rehberlik eden değerli arkadaşım Ufuk DEMİR'e teşekkür ederim.

Deneysel çalışmam süresinde yardımlarını esirgemeyen Vet. Hekim Sait ELMAS'a teşekkür ederim.

Tezimin biyokimyasal analizlerin yapılmasında rehberlik eden değerli hocam Biyokimya A. D. Dr. Öğretim Üyesi Hakan TÜRKON'a teşekkür ederim.

Tezimin bir diğer biyokimyasal parametresi olan kortikosteron analizinin yapılmasında rehberlik eden İnönü Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Sedat YILDIZ'a teşekkür ederim.

Tezimin genetik analizleri aşamasında katkı sağlayan sayın hocam Biyofizik Anabilim Dalı Dr. Öğretim Üyesi Rahime Özlem ÖZTOPUZ ve Arş. Gör. Mehmet Akif OVALI'ya teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca maddi manevi desteklerini hissettiğim sevgili babam İsmail SAFİ ve biricik annem Nevin SAFİ'ye hürmetlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2017-1218 sayılı karar ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No</b>
<b>TEZ ONAY FORMU</b>	II
<b>THESIS APROVAL FORM</b>	III
<b>BEYAN</b>	IV
<b>ÖZET</b>	V
<b>ABSTRACT</b>	VI
<b>TEŞEKKÜR</b>	VII
<b>İÇİNDEKİLER</b>	VIII
<b>SİMGE VE KISALTMALAR</b>	XI
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b>	XII
<b>TABLolar LİSTESİ</b>	XIII
<b>RESİMLER LİSTESİ</b>	XIV
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. Pineal Bez ve Melatonin	4
2.1.1. Pineal Bez	4
2.1.2. Melatonin	6
2.1.2.1. Melatonin Tarihçesi	6
2.1.2.2. Melatonin Reseptörleri	7
2.1.2.3. Melatoninin Sentezi ve Metabolize Edilmesi	8
2.1.2.4. Melatoninin Antioksidant/Prooksidant Eklileri	11
2.1.2.5. Melatonin ve Kalp	12
2.2. Egzersiz	14
2.2.1. Egzersiz Metabolizması	14
2.2.2. Egzersiz ve Kalp	14
2.3. Tümör Nekroz Faktör- Alfa (TNF- $\alpha$ )	18
2.4. Nükleer Faktör Kappa $\beta$ (NF- $\kappa\beta$ )	21
2.5. Kardiyak Troponin I (cTn I)	23
2.6. Kreatin Kinaz- Miyogloblin B (CK-MB)	26
2.7. Iskemi Modifiye Albumin (IMA)	27

2.8. Prokalsitonin (PCT)	28
2.9. Kortikosteron (CORT)	29
2.10. Toll-like Reseptör 4 (TLR 4)	31
2.11. Apoptozis	33
2.11.1. Apoptoz'un Düzenlenmesi	33
2.11.2. Bcl-2 Ailesi	34
2.11.3. Kaspaz 3 (Casp 3)	34
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>37</b>
3.1. Hayvan Materyali Ve Deney Ortamı	37
3.2. Grupların Oluşturulması	37
3.3. Yöntem	38
3.3.1. Melatonin Uygulanması	38
3.3.2. Vehicle Uygulanması	39
3.4. Hayvanlar Üzerinde Yapılan Uygulamalar	39
3.4.1. Anestezi İşlemi	39
3.4.2. Pinealektomi	40
3.4.3. Egzersiz Protokolü	42
3.4.4. Kanın Alınması	43
3.4.5. Kalbin Alınması	43
3.5. Hematolojik Analizler	43
3.5.1. Lökosit Sayımı	43
3.5.2. Lökosit Tiplerinin Belirlenmesi	43
3.6. Biyokimyasal Analizler	45
3.6.1. ELISA Analizleri	45
3.6.1.1. TNF- $\alpha$ ELISA Prosedürü	45
3.6.1.2. NF- $\kappa\beta$ ELISA Prosedürü	47
3.6.1.3. cTnI ELISA Prosedürü	47
3.6.1.4. CK-MB ELISA Prosedürü	47
3.6.1.5. IMA ELISA Prosedürü	48
3.6.1.6. PCT ELISA Prosedürü	48
3.6.1.7. Hidroksimelatonin Sülfat (6-HMS) ELISA Prosedürü	48
3.6.1.8. Kortikosteron ELISA Prosedürü	49

3.7. Genetik Analizler	49
3.7.1. Total RNA İzolasyonu	49
3.7.2. cDNA Eldesi	50
3.7.3. RT-PCR Çalışması	51
3.8. İstatistiksel Analiz	52
<b>4. BULGULAR</b>	53
4.1. Sıçanlarda Canlı Ağırlıkları	53
4.2. Hematolojik Veriler	53
4.2.1. Kan Lökosit Düzeyindeki Değişiklikler	54
4.3. Biyokimyasal Veriler	55
4.3.1. Kan TNF- $\alpha$ Düzeyindeki Değişiklikler	55
4.3.2. Kan NF- $\kappa\beta$ Düzeyindeki Değişiklikler	56
4.3.3. Kan cTnI Düzeyindeki Değişiklikler	57
4.3.4. Kan CK-MB Düzeyindeki Değişiklikler	58
4.3.5. Kan IMA Düzeyindeki Değişiklikler	59
4.3.6. Kan PCT Düzeyindeki Değişiklikler	60
4.3.7. Kan CORT Düzeylerindeki Değişimler	61
4.4. Genetik Veriler	62
4.4.1. Sol Ventrikülde TLR-4 Düzeyindeki Değişiklikler	62
4.4.2. Sol Ventrikülde Kaspaz-3 Düzeyindeki Değişiklikler	63
<b>5. TARTIŞMA</b>	64
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	73
<b>7. KAYNAKLAR</b>	74
EK-1 Gruplara Ait İstatistiksel Veriler ve Standart Sapmalar	95
EK-2 Etik Kurul Onay Formu	97
EK-3 Özgeçmiş	98
EK-4 Spiralli Tez Kontrol Formu	99
EK-4 Spiralli Tez yazım Listesi	100

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

SCN:	Suprakaryazmik Nükleus
cAMP:	Siklik Adenozin Mono Fosfat
cGMP:	Siklik Guanizin Mono Fosfat
ROR:	Retinoid O Reseptörü
5-HT:	5-Hidroksitriptamine
RONs:	Reaktif Oksijen/Nitrojen Türleri
iNOS:	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
TNF- $\alpha$ :	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
NF- $\kappa\beta$ :	Nükleer Faktör Kappa $\beta$
cTnI:	Kardiyak Troponin I
CK-MB:	Kreatin Kinaz Miyogloblin B
PCT:	Prokalsitonin
IMA:	İskemi Modifiye Albumin
CORT:	Kortikosteron
TLR 4:	Toll-like Reseptör 4
CASP 3:	Kaspaz 3
pg/ml:	Pikogram/mililitre
mg/kg:	Miligram/kilogram
m/dk:	Metre/dakika
km/sa:	Kilometre/saat
HSPs:	Isı Şoku Proteinleri
LPS:	Lipopolisakkarit
NO:	Nitrik oksit
NE:	Norepinefrin
TNFR:	TNF Reseptör
PLT:	Pinealektomi
PVN:	Paraventriküler Nükleus
SCG:	Superior Servikal Gangliyon
HTP:	Hidroksitriptofan

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1. Pineal bezin insan beynindeki konumu	4
Şekil 2. Sıçanlarda pineal bezin konumu	5
Şekil 3. Melatonin sentez basamaklarının gösterimi	10
Şekil 4. Kalp kasında iskemik hasara melatoninin koruyucu etkilerinin şematize edilmesi	13
Şekil 5. Akut yoğun egzersizin kalp kası üzerine etkilerini gösteren bazı moleküler mekanizmalar	17
Şekil 6. Akut yoğun egzersize bağlı oksidatif stresin ve inflamasyonun miyokart hasarı oluşturma mekanizmasının farklı bir gösterimi	18
Şekil 7. TNF'in programlanmış hücre ölümü, proliferasyon ve inflamasyon içeren fizyolojik süreçlerdeki rolünün şematize edilmesi	20
Şekil 8. NF- $\kappa$ B'nin klasik yol ve alternatif yol ile uyarılmasının şematik gösterimi	22
Şekil 9. Kardiyomiyositlerden kardiyak troponin I salınımı	25
Şekil 10. Egzersiz ve dinlenme durumunda CK ve ATP yenilenme mekanizması	27
Şekil 11. Kortizol salınım mekanizması	30
Şekil 12. Apoptozisin intrinsik ve ekstrinsik yollarının gösterimi	36
Şekil 13. Tüm gruplara ait kan lökosit sayısı değerlerindeki değişimler	54
Şekil 14. Tüm gruplara TNF- $\alpha$ ait değerleri	55
Şekil 15. Tüm gruplara NF- $\kappa$ B ait değerleri	55
Şekil 16. Tüm gruplarda cTnI düzeyleri	56
Şekil 17. Tüm gruplara CK-MB ait değerleri	57
Şekil 18. Tüm gruplarda IMA düzeyleri	58
Şekil 19. Tüm gruplara PCT ait değerleri	59
Şekil 20. Tüm gruplara ait kortikosteron (CORT) düzeylerindeki değişimler	60
Şekil 21. Gruplarda TLR-4 düzeyleri	61
Şekil 22. Gruplarda kaspaz-3 düzeyleri	62
	63

## TABLÖLAR LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1.</b> cDNA Sentezi Protokolü	50
<b>Tablo 2.</b> PCR Koşulları	50
<b>Tablo 3.</b> Real Time PCR ingrediyeñt miktarları	51



## RESİMLER LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Resim 1.</b> Pinealektomi operasyonunun yapılışı	41
<b>Resim 2.</b> Egzersiz protokolünün uygulanması	42
<b>Resim 3.</b> Boyanan lökositlerin 100X objektifte görüntüsü	44
<b>Resim 4.</b> TNF- $\alpha$ kalibrasyon konsantrasyonları	45
<b>Resim 5.</b> NF- $\kappa\beta$ kalibrasyon konsantrasyonları	47
<b>Resim 6.</b> cTnI kalibrasyon konsantrasyonları	47
<b>Resim 7.</b> CK-MB kalibrasyon konsantrasyonları	47
<b>Resim 8.</b> IMA kalibrasyon konsantrasyonları	48
<b>Resim 9.</b> PCT kalibrasyon konsantrasyonları	48
<b>Resim 10.</b> 6-Hidroksimelatonin Sülfat kalibrasyon konsantrasyonları	48



## 1. GİRİŞ

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) pineal bez hücreleri tarafından üretilen ve salgılanan bir hormondur. Sirkadiyen ritim, uyku, üreme ve bağışıklık gibi birçok sistem ve işleyişte görev alır (Yazıcı ve Köse, 2004). Melatonin salgısını düzenleyen en önemli uyaran ışıktır. Işık enerjisindeki değişimler gözü etkileyerek, pineal beze sempatik sinirler ile ulaşır. Bir dizi biyokimyasal etkileşimden sonra pineal bezden melatonin sentezi başlatılmış olur. Melatonin lipofilik özelliğinden dolayı kana ve diğer dokulara kolaylıkla geçer (Wurtman ve Axelrod., 1965).

Melatoninin kardiyovasküler sistem üzerine olan koruyucu etkileri çok iyi bilinmektedir. Bu etkileri antioksidan, antiinflamatuvar, immunomodülatör, antihipertansif, antiadrenerjik ve antilipidemik özelliklerine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Melatonin bu özellikleri sayesinde; kalp miyositlerinde apoptozisin ve nekrozisin azalmasına, kalp hipertrofilerinin önlenmesine, fibrozis gelişiminin yavaşlamasına ve kan basıncının düşmesine yol açarak kalp üzerine güçlü bir koruyucu etki gösterir. Bu nedenle, melatonin kalp damar sistemi hastalıklarının önlenmesi ve iyileştirilmesinde potansiyel bir farmakolojik ajan olarak düşünülmektedir (Nduhirabandi ve Maarman, 2018).

Melatoninin birçok hastalıkta koruyucu bir ajan olarak dışarıdan verilmesi düşünüyor olmasına rağmen günümüzde birçok farklı nedene bağlı olarak melatonin yoksunluğu olduğu da bir gerçektir. Özellikle melatonin salgılanmasının başladığı gece saatlerinde cep telefonu, bilgisayar ve televizyon seyredilmesi veya başka bir ışık kaynağına maruz kalınması melatonin salgısında önemli azalmalara yol açmaktadır. Bu durum melatoninin koruyucu etkilerinin ortaya çıkmasını engellemektedir (Chindamo ve ark., 2019).

Düzenli fiziksel egzersiz kan basıncının düzenlenmesinde ve kalp fonksiyonlarının iyileştirilmesinde çok faydalı bir uygulamadır (Stephen ve Kolwicz, 2018). Ancak yüzme ve koşma gibi yoğun egzersizler yeterli ön antrenmanlar yapılmadan uygulanırsa kalpte oksidan ajanların ortaya çıkmasına yol açarak apoptozisi uyarır ve kalp kası hücrelerinde hasar oluşmasına neden olur (Slu ve ark., 2004; Ahmadiasl ve ark., 2012).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) fazla üretimi, kalp miyositlerinde DNA kırılmasına da neden olurlar (Sahna ve ark., 2007). Kalp miyositlerinin postnatal dönemde kendini yenileme kapasitesi olmadığı/düşük olduğu için her bir kalp hücre hasarı kalp ejeksiyonunda bir azalmaya yol açar. Dolayısı ile kalp miyositlerini mümkün olduğunca hasara karşı korumak ya da herhangi bir şekilde hasarlanan hücrenin hızlı bir şekilde iyileşmesini sağlamak etkin bir kalbe sahip olmanın en temel kuralıdır.

Kalp kası hücrelerinde meydana gelen apoptozisin moleküler mekanizması vücuttaki diğer hücrelerde olduğuna benzer şekilde gerçekleşir ve kaspaz-3 proapoptotik bir molekül olarak etki gösterir (Kwak, 2013). Akut tüketici egzersiz kalp kası hücrelerinde apoptozisi tetiklemesinin yanı sıra yangısal süreçleri de başlatabilir. Bu süreçlerde birçok sitokin görev almakta ve farklı bazı yollar üzerinden yangısal süreçler uyarılmaktadır. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) önemli bir proinflamatuvar sitokin olarak bilinir ve tüketici egzersizlerde kalp kasındaki düzeyleri de artar (Suzuki 2018). Yangısal süreçlerde anahtar rol oynayan reseptörlerden bir tanesi de hücre zarına gömülü şekilde bulunan ve toll like reseptör-4 (TLR-4) olarak isimlendirilen protein yapısında bir moleküldür. TLR-4 kalp kasında, yangısal süreci uyaran veya reaktif oksijen türlerinin artıran egzersiz vb. durumlarda miyosit içerisindeki nükleer faktörü aktifleştirerek nükleer faktör kabba  $\beta$ 'ye (NF- $\kappa\beta$ ) dönüşmesini sağlar. Aktifleşen NF- $\kappa\beta$  ise nükleus içerisinde TNF- $\alpha$  gen ekspresyonunu uyararak yangısal süreçlerin başlamasına yol açar (Zhou ve ark., 2018).

Akut yoğun egzersiz antrene olmayan bireylerde daha fazla olmak üzere bir stres kaynağı olarak da görülebilir (Donatto ve ark., 2010). Stres durumlarında insanlarda kortizol salgısı artarken sıçanlarda aynı işlev kortikostoren (CORT) gerçekleştirilir. Bu nedenle sıçanlarda kortizol değil kortikosteron düzeyleri ölçülmektedir (Contarteze ve ark., 2008). Kalpte geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz miyokart hasarları birlikte Akut koroner sendrom (AKS) olarak tanımlanır. AKS'de kalp kasında meydana gelen iskeminin süresi miyokart hasar ve nekrozunun düzeyini belirler. Miyokart hasarının göstergesi olarak kreatin kinaz miyogloblin b (CK-MB) ve kardiyak troponin I (cTnI) yaygın olarak kullanılan biyokimyasal belirteçlerdir (Dawie ve ark., 2011).

Bu enzimlerin AKS teşhisinde özgünlüğünün düşük olması, nekroz oluşmadan ortaya çıkmamaları ve AKS sonrası uzun bir süreçte kandaki düzeylerinin artması daha özgün belirteçlerin ortaya konulmasını zorunlu kılmıştır. Bu amaçla son yıllarda en fazla başvurulan moleküllerden bir tanesi de iskemi modifiye albümin (İMA)'dır. Bu nedenle İMA AKS teşhisinde, CK-MB ve cTnI'nın dezavantajlarını ortadan kaldıran daha güvenli bir belirteç olarak kabul edilmektedir (Can ve Yosunkaya, 2017). Bu nedenle çalışmamızda egzersiz sonrası İMA düzeyleri de belirlenmiştir.

Normal şartlarda sepsis ve bakteriyel enfeksiyonların bir göstergesi olarak kullanılan prokalsitoninin (PCT) son yıllarda iskemik kalp hastalarında da bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir. Kardiyovasküler hastalıklarda Pct'nin rolü konusunda oldukça sınırlı düzeyde çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bir tanesinde Pct'nin kalp krizlerinde teşhis amaçlı kullanılabilmesi ileri sürülmüştür (Banach ve ark., 2018).

Bu bilgiler ışığında yapılan bu çalışmada pinealektomi yapılarak melatonin yoksunluğu oluşturulmuş veya dışarıdan melatonin verilmiş sıçanlara akut yoğun egzersiz yaptırılarak kalp kasında bazı apoptozis ve yangısal belirteçlerin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla;

- ✓ Yangısel süreçlerin ortaya konulması için; kanda TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa\beta$ , İMA ile kalp TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri,
- ✓ Apoptozis ve ilişkili hücre hasarı belirteçlerini ortaya koymak için; kan cTnI ve CK-MB düzeyleri ile kardiyak kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri,
- ✓ Egzersiz uygulamasının doğuracağı stresi belirlemek için kan kortikosteron seviyeleri belirlenmiştir.

Sonuç olarak;

- ✓ Akut yoğun egzersizin kalp hücrelerinde hasar oluşturup oluşturmayacağı, hasar göstergesi olarak moleküler ve biyokimyasal belirteçlerin düzeyindeki değişimler,
- ✓ Hasarın moleküler ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi,
- ✓ Pineal bez kaynaklı melatonin yoksunluğu veya ilavesinin, akut yoğun egzersizde kalp kası hücreleri üzerinde koruyucu etkilerinin olup olmadığını gösterecek bilimsel verilere ulaşılması hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

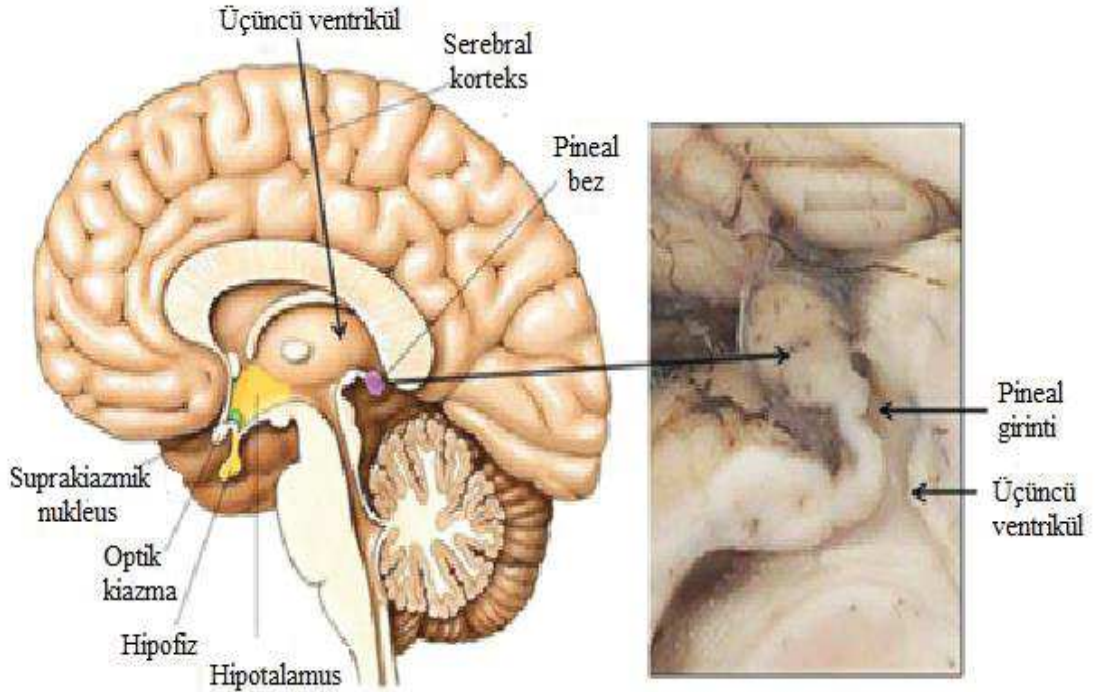
### 2.1. PİNEAL BEZ VE MELATONİN

#### 2.1.1. Pineal Bez

Pineal bez başlıca sekresyon ürünü melatonin olan sirkumventrikular bir organdır (Reiter 1991). İlk keşfedildiği yıllarda melatonin yalnızca pineal bezden salgılanan bir hormon olarak biliniyor olmasına rağmen günümüzde neredeyse tüm hücreler, dokular ve organların melatonin salgıladığı bilinmektedir (Pevet ve ark., 2017).

Pineal bez, insanlarda beynin geometrik merkezinde bulunur. İnsan pineal bezi yaklaşık olarak pirinç tanesi büyüklüğünde ve 150 mg ağırlığa sahiptir (Golan ve ark., 2002).

Üçüncü ventrikülün postero-dorsal tarafı üzerinde konumlanmış pineal bez, pineal oylukta serebrospinal sıvı ile doğrudan temas halindedir (Hewing 1978). Üçüncü ventrikülün serebrospinal sıvısında melatoninin daha yüksek olmasına neden olur (Tricoire ve ark., 2002).



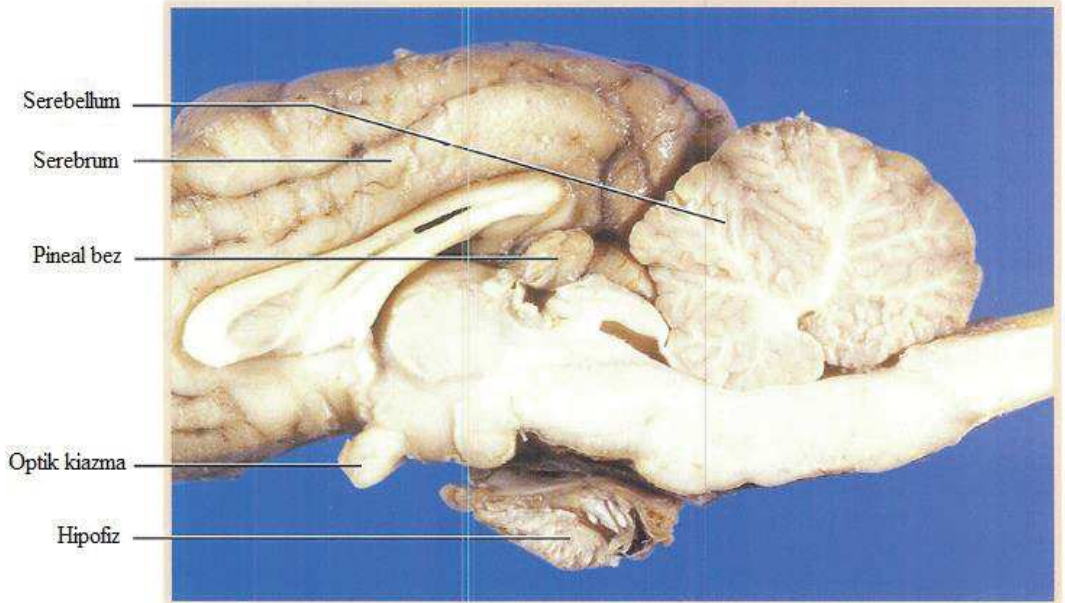
Şekil 1. Pineal bezin insan beynindeki konumu (Reiter ve ark., 2015).

Bir fotonöroendokrin organ olan pineal bezin melatonin sentezi ışık tarafından düzenlenir. Işık varlığı veya yokluğu ise melatoninin günlük ritminin ortaya çıkmasını sağlar (Ganguly ve ark., 2002).

Pinealosit, pineal bezin temel hücresidir. Bununla birlikte pineal bezde 3 farklı hücre tipinin bulunduğu bilinmektedir. Bunlar;

1. Tipik bir fotoreseptör (PhR),
2. Literatürde genelde fotoreseptör olarak adlandırılan bir modifiye fotoreseptör (mPhR),
3. Fotoreseptör olmayan pinealosit (PSS) hücreleridir (Meissl ve ark., 1986).

Sıçanlarda pineal bezden melatonin sentezinin nokturnal artışı bu organı innerve eden sempatik sinirlerden norepinefrinin gece salınımı tarafından kontrol edilir (Klein ve ark., 1991). Sıçan pineal bezi yaklaşık olarak bir toplu iğne kafası büyüklüğündedir. Anatomik olarak insan pineal bezine göre farklı bir yerleşim gösterir ve beyin zarları çıkartıldıktan sonra tectumun yüzeyinden rahatlıkla pineal beze ulaşılabilir. Erişkin pineal bezinin medullaya uzanan transvers zarla ayrılmış medulla ve korteks bölgeleri vardır (Calvo ve Boya, 1981).



**Şekil 2.** Sıçanlarda pineal bezin konumu (Smith ve Schenk, 2001).

Pinealositlerin sitoplazmaları granüler endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş golgi aparatı, yoğun bir sitoplazma ve yoğun içerikli granüller, sinaptik bant mikrotübülleri, lipit damlacıkları ve çok fazla sayıda mitokondri içerir. Mitokondriler sıklıkla çekirdek etrafında yer almaktadır. Sitoplazmik uzantıları olan mikrotübüllerin sentriollerden köken aldığı düşünülür (Welsh ve Reither, 1978). Pinealositler birbirleri ile neksus, desmozom ve ara bağlantı kompleksleri ile bağlanırlar (Leeson ve ark., 1985).

Ayrıca pinealositler hem paranöron hem de amin prekürsörlerini alan ve dekarboksile eden (APUD) hücre serisine ait özellikler de taşırlar. Yoğun çekirdekli olan pinealositler, granüler ve agranüler veziküller içeren aktif salgılanabilen yapılara sahiptirler (Saunders ve Arendt, 1995).

## **2.1.2. Melatonin**

### **2.1.2.1. Melatoninin Tarihçesi**

Melatonin ilk olarak 1958 yılında Lerner tarafından keşfedilmiştir (Lerner ve ark., 1958). Melatonin salgısının mevsimsel ve sirkadiyen bir ritim gösterdiği ise yıllar sonra ancak anlaşılabilmiştir.

Melatonin sentezinin anahtar enzimlerinin ve melatonin reseptörlerinin birçok dokuda varlığı, melatoninin güçlü antioksidan ve antiinflamatuar özelliklerinin ortaya konulması, önceleri sadece bir hormon olarak tanımlanan bu molekülün günümüzde çok yönlü özelliklere sahip bir ajan olarak dikkat çekmesine neden olmuştur (Reiter 1991; Reiter ve ark., 2010).

Pineal bez ve melatonin konusunda ilk yıllarda yapılan ve kilometre taşı olarak kabul edilen bazı önemli keşifler aşağıda belirtilmiştir.

- Pineal bezin fizyolojik aktivitesinin fotoperiyodik çevre tarafından etkilendiğinin belirlenmesi (Quay 1956; Hoffman ve Reiter (a), 1965),
- Pineal bezin N-acetyl-5-methoxytryptamine ya da endokrin özelliği olan melatoninini içerdiğinin ortaya konulması (Lerner ve ark., 1958, Lerner ve ark., 1959),
- Pineal bezin işlevlerinin sempatik innervasyon ile düzenlendiğinin anlaşılması (Reiter ve Hester, 1965; Wurtman ve ark., 1964).

- Rodentlerde ilk başarılı pinealektomi operasyonunun yapılması (Hoffman ve Reiter (b), 1965).

### 2.1.2.2. Melatoninin Reseptörleri

Melatoninin birçok organ ve dokuda hem hücre içinde hem de hücre membranında reseptörleri bulunmuştur. Diğer taraftan melatonin etkilerini hem reseptör bağımlı hem de reseptör bağımsız olarak gerçekleştirebilir.

Melatonin reseptörleri MT1 ve MT2 olarak tanımlanmıştır ve bunlar hücre membranında karakterize edilmiş guanin-nukleotit bağılı düzenleyici protein (G protein) ailesine aittirler (Emet ve ark., 2016). Melatonin ayrıca retinoid ilişkili orphan nuklear hormon reseptör ailesi (RZR/ROR) için de doğal bir ligandır (Hardeland ve ark., 2011).

Melatoninin MT1 reseptörleri aracılığı ile, kanser hücrelerinde proliferasyonu ve nöronal yangıyı inhibe ettiği, üreme ve metabolik işlevleri kolaylaştırdığı belirlenmiştir (Lew ve Flanders, 1999; Liu ve ark., 2016). Melatonin tarafından MT1 reseptörlerinin aktivasyonu Gq11 aracılığı ile sitozolik kalsiyum düzeylerinin artışına yol açarken, G proteinler üzerinden cAMP'nin inhibisyonuna bağılı birçok farklı yanıtlara da neden olur (Brydon ve ark., 1999).

Melatoninin reseptör bağımlı etkileri kalpte yoğun olarak ortaya çıkmakta (kardiyomiyositler, sol ventrikül ve koroner arterler) ve vasküler membran melatonerjik reseptörler (MT1 ve MT2) aracılığı ile gerçekleşmektedir (Ekmekcioglu ve ark., 2003; Slominski ve ark., 2012).

Melatonin MT2 reseptörleri üzerinden; vazodilatasyonu ve immun yanıtı uyarırken arteriyollerde lökosit birikmesini ve retina dopamin salınımını inhibe eder. Melatonin reseptör bağımsız etkilerini ise mitokondriyal yolakları ve antioksidant sistemi etkileyerek gösterir (Hardeland ve ark., 2011). MT2 reseptörlerine melatonin bağlanması cAMP ve cGMP inhibisyonuna neden olur (Petit ve ark., 1999).

Günümüzde, üçüncü bir melatonin bağlanma bölgesi olarak guinone reduktaz 2 (MT3) de tanımlanmıştır. Bu reseptör hücrelerin ksenobiyotik metabolizması ile ilişkilidir, fakat bu enzimi MT1 ve MT2 gibi klasik bir melatonin reseptörü olarak tanımlamak zordur (Nosjean ve ark., 2000).

Melatoninin nukleusta  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve ROR orphan olmak üzere dört farklı alt birimi olan reseptörlere sahiptir (Becker-Andre ve ark., 1994). Melatonin ayrıca sitoskeleton regülesyonu ve nüklear reseptörlerin kontrolünden sorumlu kalmodulin ve kalretikulin içeren sitozolik proteinler ile etkileşim halindedir (Benitez-King ve ark., 1993; Macias ve ark., 2003).

### 2.1.2.3. Melatonin Sentezi ve Metabolize Edilmesi

Melatonin başlıca pineal bezden sentezlenir. Pineal bezden melatonin dışında peptidler ve indolaminler de salgılanmaktadır. İndolaminlerden en önemlisi melatonin olarak adlandırılan ve 232 molekül ağırlıklı N-asetil-5-metoksitriptamindir (Ebels ve Balemans, 1986). Gece boyunca suprakiazmik nukleus (SCN) çekirdekten gelen aksiyon potansiyelleri post sinaptik aralıkta norepinefrin salınımını başlatır. Norepinefrin melatonin salgılanmasını düzenleyen en önemli uyarandır. Norepinefrin melatonin salgılatıcı etkisini postsinaptik pinealosit membranındaki  $\alpha$  ve  $\beta$  reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirir. Melatonin sentezinin % 85'i  $\beta$  reseptörleri, %15'i ise  $\alpha$  reseptörlerinin uyarılması ile ortaya çıkar (Ustundag ve Canatan, 1999).

Melatonin sentezi, aktif transportla triptofanın pineal bez içine girmesi ile başlar (Eren ve Dursun 1992). Triptofan, bir mitokondriyal enzim olan triptofan 5-hidroksilaz enzimi tarafından 5- hidroksitriptofana (5-HT) dönüştürülür, bu ise sitoplazmik bir enzim olan aromatik amino asit dekarboksilaz aracılığı ile 5-hidroksitriptamine (serotonin) dönüştürülür. Daha sonra, arilalkilamin N-asetiltransferaz (AANAT) tarafından serotonin asetilasyona uğratarak, N-Asetil serotonin oluşur ve sonuçta hidroksiindol-O- metiltransferaz (HIOMT) enzimi aracılığı ile melatonin sentezlenir (Galzin ve ark., 1988).

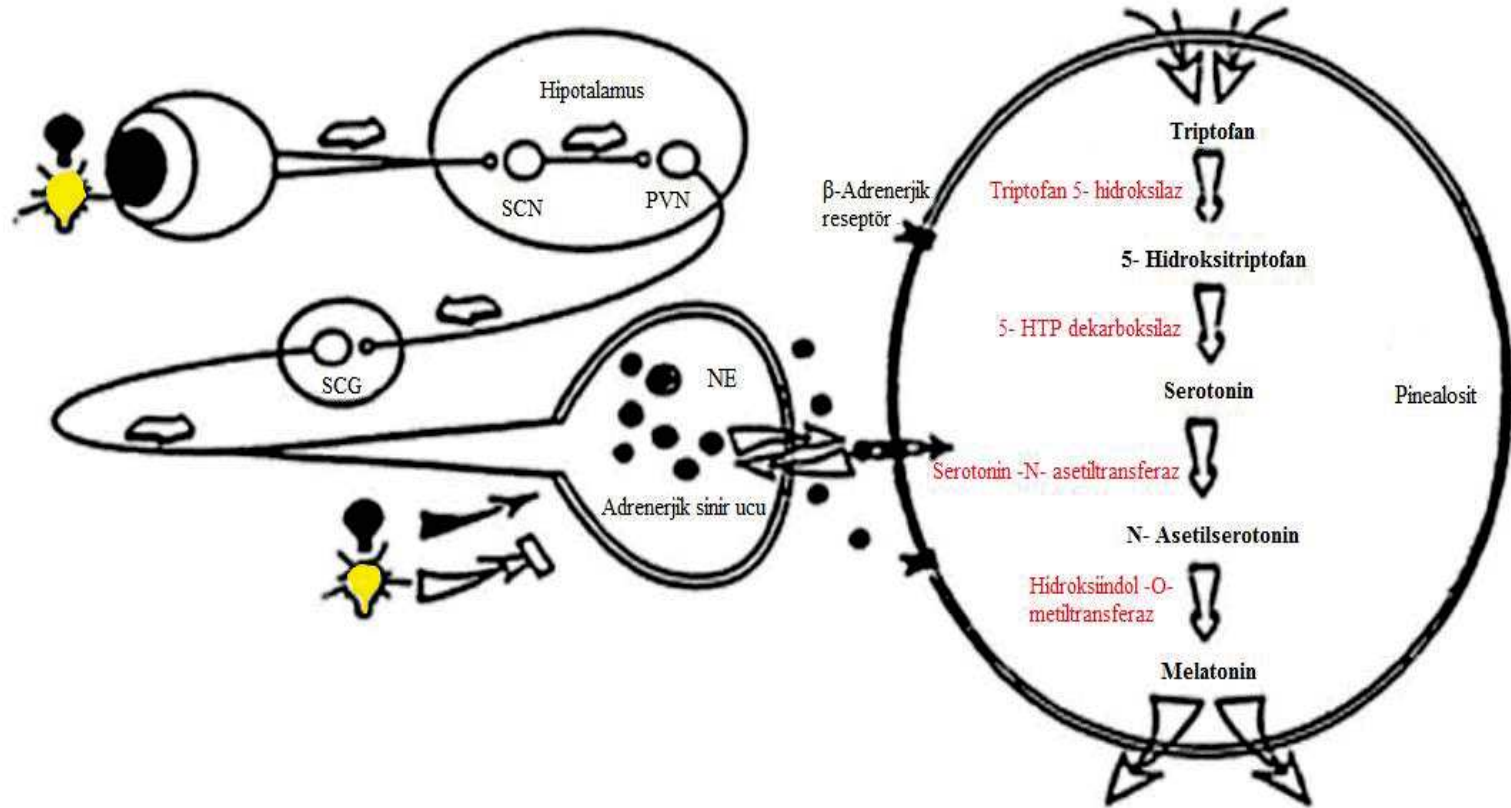
Sıçanlarda gece AANAT proteininin sentezindeki artıştan dolayı AANAT enzim aktivitesinde yükselme görülür (Maronde ve Stehle, 2007). Sempatik sinir sisteminden norepinefrinin gece boyunca salınımının cAMP seviyelerini neredeyse yüz kat artırdığı hem  $\alpha$  hem de  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerdeki ölçümler ile anlaşılmaktadır (Klein 1985).



İnsanlarda, plazma melatonin konsantrasyonu gece 02:00-04:00 saatleri arasında pik değerine ulaşır. Melatonin sekresyonu erişkin bireylerde genellikle saat 21:00-22:00 arası başlar ve 07:00-09:00 arasında ise üretim sona erer. Melatonin yüksek lipofilik özelliğinden dolayı tüm biyolojik sıvı ve dokulara kolaylıkla erişebilir. Plazmada % 70'i albümine bağlı olarak bulunur (Ercument ve ark., 2000).

İnsanda melatonin ilk olarak karaciğerde ve daha sonra böbreklerde metabolize olur. Karaciğerde % 90'ı mikrozomal enzimlerle metabolize edilir ve son ürün olan 6-hidroksimelatonin sülfat (6-HMS) olarak % 70-80'i idrarla atılır (Çam ve Erdoğan, 2003).





Şekil 3. Melatonin sentez basamaklarının gösterimi (Eren ve Dursun, 1992).

#### 2.1.2.4. Melatonin Antioksidant/Prooksidant Etkileri

Melatoninin antioksidan etkileri ilk olarak Janus ve ark., (1991) tarafından ortaya konulmuştur. Melatonin hücrel membranlardan içeri alındığında, membran fosfolipidlerinin polar başlarına yakın çift tabakalı lipitte yüzeysel olarak konumlanır (Ceraulo ve ark., 1999). Bu pozisyon serbest radikal süpürücü olarak iş yapmasına olanak sağlarken ayrıca membranların oksidatif hasara karşı direnebilmesine de dolaylı yoldan imkan sağlar (Garcia ve ark., 1997; Garcia ve ark., 1998).

Melatonin, egzersizin neden olduğu iskelet kaslarında oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun neden olduğu doku hasarını azalttığı ile ilgili birçok deneysel model vardır. Melatonin doku hasarını azalmak için NF- $\kappa$ B aktivasyonunu inhibe ederek önemli bir antiinflamatuvar etki gösterir. Melatonin tedavi çalışmalarında ise akut egzersizin neden olduğu iskelet kası doku hasarını NF- $\kappa$ B yolağını bozarak ve iNOS'un aşırı üretimini bloke ederek engeller (Veneroso ve ark., 2009).

Melatonin, nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma ve iskemi/reperfüzyonun deneysel modellerinde oksidatif stresele ilişkili süreçlere karşı koruyucu etki göstermiştir. Buna ek olarak immün sistemin modülatörü olarak, ROS karşı koruyucu ve sirkadiyen ritmi düzenleyici olarak rol oynar (Guerrero ve Reiter, 2002).

### 2.1.2.5. Melatonin ve Kalp

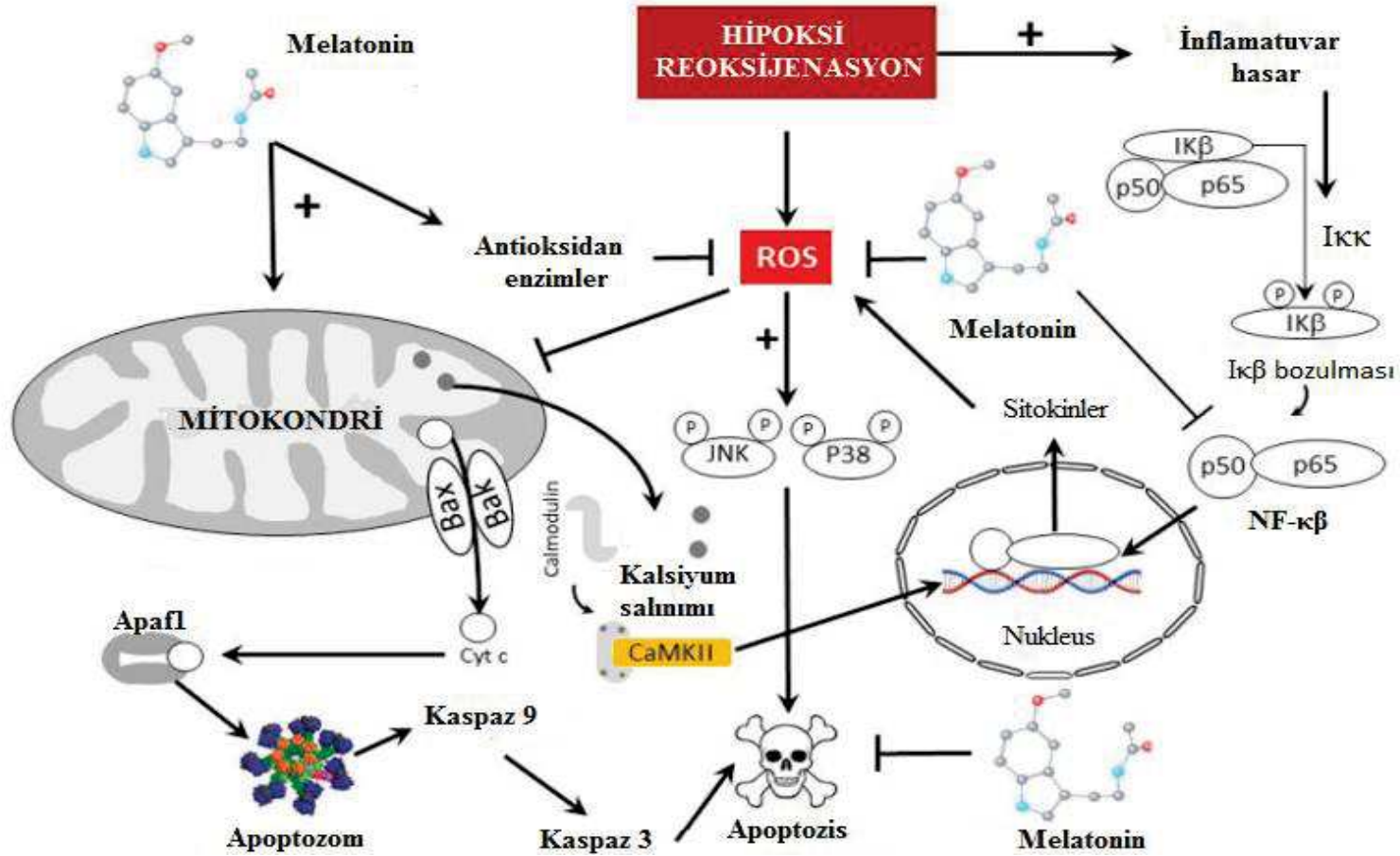
Günlük ritim ile kalp atımı sayısı, kan basıncı, platelet ve endotelial işlevler arasında ilişki olduğu günümüzde bilinmektedir. Nitekim yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ventriküler aritmiler, ani kalp ölümü, miyokard infarktüsü, iskemik inme gibi kardiyovasküler hastalıkların sabah vakti doruğa ulaştığı rapor edilmiştir. Miyokardiyositlerde, vasküler düz kas hücrelerinde ve endotelial hücrelerde sirkadiyen ritmin varlığı belirtilmektedir. (Marsh ve ark., 1990; Muller 1999).

Kardiyovasküler sistemin herbir hücrelesindeki sirkadiyen saatler nörohormonel uyarının (uyanmadan önce sempatik sinir uyarısının artması gibi) başlangıcından itibaren kardiyovasküler fonksiyonu etkileme potansiyeline sahiptir, dolayısıyla uygun hızlı yanıt alır (Young 2006).

Melatonin intrasellüler  $Ca^{+2}$  kümeleşmesini ve reaktif oksijen türlerinin üretimini inhibe ederek morfolojik hasarı uyaran iskemi/reperfüzyona karşı sıçan ventriküler miyositlerini koruyucu etki gösterir (Salie ve ark., 2001). Araştırmalar, iskemi/reperfüzyon hasarı sonrası kalp dokusu hasarı ve anormal kalp işlevleri üzerine farmakolojik dozda uygulanan melatoninin yararlı etkileri olduğunu göstermiştir (Szarszoi ve ark., 2001; Lee ve ark., 2002). Melatoninin antioksidan etkilerinin önemli bir kısmı süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon reduktaz gibi antioksidan enzimleri uyarılmasından, iNOS'u ise inhibe etmesinden kaynaklanabilir (Rodriguez ve ark., 2004; Sahna ve ark., 2005).

Melatonin tedavisi apoptozisi (kaspaz 3) bloke edip, inflamatuvar yanıtı sınırlandırarak miyokardiyal hasarı hafifletir (Reiter ve ark., 2016).

Konjestif kalp hasarı, iskemik kalp hastalığı, hipertansiyon gibi birçok patolojik durumda ve akut miyokart infarktüsü geçiren hastalarda melatonin seviyeleri düşük bulunmuştur (Seithikurippu ve ark., 2017).



Şekil 4. Kalp kasında iskemik hasara melatoninin koruyucu etkilerinin şematize edilmesi (Reiter ve ark., 2016).

## **2.2. EGZERSİZ**

Egzersiz, fiziksel olarak vücudu desteklemek ya da korumak amacı ile, planlı olarak yapılan tekrarlı vücut hareketleridir (Biddle 1995).

### **2.2.1. Egzersiz Metabolizması**

Fiziksel aktivite için yüksek düzeyde enerjiye ihtiyaç vardır. Yüzme, bisiklet ve koşma gibi egzersizler enerji ihtiyacını 120 kat artırabilir. Bu enerjinin kaynağı; karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmalarından köken alan organik fosfat bileşikleridir (Samuel ve Toriola, 1998).

Egzersizde aerobik veya anaerobik yollarla karbonhidratlar ve yağlar yıkılarak ATP üretilir (Sloan ve Weir, 1970). Kullanılan enerjinin kaynağı egzersizin türü, şiddeti ve süresiyle yakından ilişkilidir.

Egzersiz izotonik (dinamik) ve izometrik (statik) olarak temelde iki sınıfta incelenir. Bu egzersiz tipleri de enerji kaynağı açısından kendi içerisinde aerobik ve anaerobik olarak iki farklı şekilde değerlendirilir (Korkmaz ve Öter, 1998).

Aerobik egzersiz, solunum kapasitesini artırmak ve kalp damar sistemini daha iyi hale getirmek için yapıldığından 'kardiyovasküler egzersiz' olarak da bilinir (Kılıç 2014). Kalp hızının % 50-80'i ile yapılan aerobik egzersiz, büyük kas grupları kullanılarak ve hafif veya orta şiddette hareketlerin uzun süreli olarak tekrar edilmesiyle yapılır. Enerji kaynağı olarak da kasta depolanan enerjinin yanında karaciğer ve kastaki glikojen kullanılır (Doğanay ve ark., 2014).

Anaerobik egzersiz ise; kalp hızının % 85-90'ı ile yapılan, egzersiz yoğunluğu ve şiddetinin arttığı, kasın miktarı, gücü ve dayanıklılığını artırmak için yapılan hareketlerden oluşur (Çavuşoğlu 2013).

### **2.2.2. Egzersiz ve Kalp**

Düzenli fiziksel egzersiz kardiyovasküler sistem üzerine bilinen faydalarının yanı sıra duyarlı bireylerde ani kalp ölümü ve akut miyokardiyal infarktüse de neden olur (Veneroso ve ark., 2009).

Akut egzersiz ile uyarılan kardiyak kas dokusunda hücre hasarı tespit edilebilmektedir. Sıçanlara uygulanan akut egzersiz sonrası miyeloperoksidaz aktivitesi, TNF- $\alpha$  ve NF- $\kappa$ B aktivitesinin arttığı gözlemlenmiş ve bunların oluşturduğu olumsuz etkilerin melatonin tarafından azaltıldığı ortaya konmuştur (Veneroso ve ark., 2009). Egzersiz yapılan birçok çalışmada, kardiyomiyosit hasarını uyarabilen, TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi sitokin seviyelerinde artış gözlenmiştir (Horton ve ark., 2003; Prabhu 2004).

Ventriküllerin sistolik ve diyastolik işlevlerini azaltarak kısa süreliğine kalpte fonksiyon bozukluğuna neden olan uzun süreli yoğun egzersizin duyarlı bireylerde akut miyokart infarktüsü ve ani ölümü tetikleme potansiyeli bulunmaktadır (Powers ve ark., 2008).

Egzersizde kalp kasını etkileyen en önemli faktörlerden bir tanesi oksidatif strestir. Egzersizin şiddetine bağlı olarak ortaya çıkan serbest radikaller kalp kasında farklı düzeylerde hasara yol açabilir. Egzersizin yoğunluğu ve süresi arttıkça metabolik süreç ve oksijen tüketimi artacağından serbest radikal oluşumu da artacaktır. Bu durum kalp kasındaki hasarın düzeyini de artırır (Çolakoglu ve ark., 1998).

Özellikle koşma ve yüzme sporları gibi yoğun bir şekilde uygulanan egzersizlerde, apoptozun uyarılması ve serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkması artan kalp hasarına yol açarak kalpte işlev kayıplarına yol açar (Ahmadiasl ve ark., 2012).

Egzersiz süresince ortaya çıkan serbest radikaller birkaç farklı yolla oluşabilir. Bunlar;

1. Süperoksit anyon radikali veren, ubikitin-sitokrom c üzerinden mitokondrideki elektron taşıma sisteminde bir zayıflama olmuş olabilir. Bu reaksiyonda, hidrojen iyonları ve elektronlar son ürün olarak su veren oksijene elektron taşıyıcısı tarafından taşınabilir ( $4H^+ + 4e^- + O_2 \rightarrow 2H_2O$ ).
2. Yoğun egzersiz süreci, vücudun belli bölgelerinde hipoksi ya da geçici olarak iskemiye neden olabilir. Aktivite artışı hipoksiyi daha da fazla artırır. Yoğun egzersizden sonra hasarlanmış bölgeler tekrar oksijenlenir ve daha sonra iskemi-reperfüzyonun ürettiği serbest radikaller meydana gelir (Apple ve ark., 2002).
3. Araşidonik asitin lipid peroksidasyonu süperoksit radikalleri üretir (Jiang ve ark., 2004).

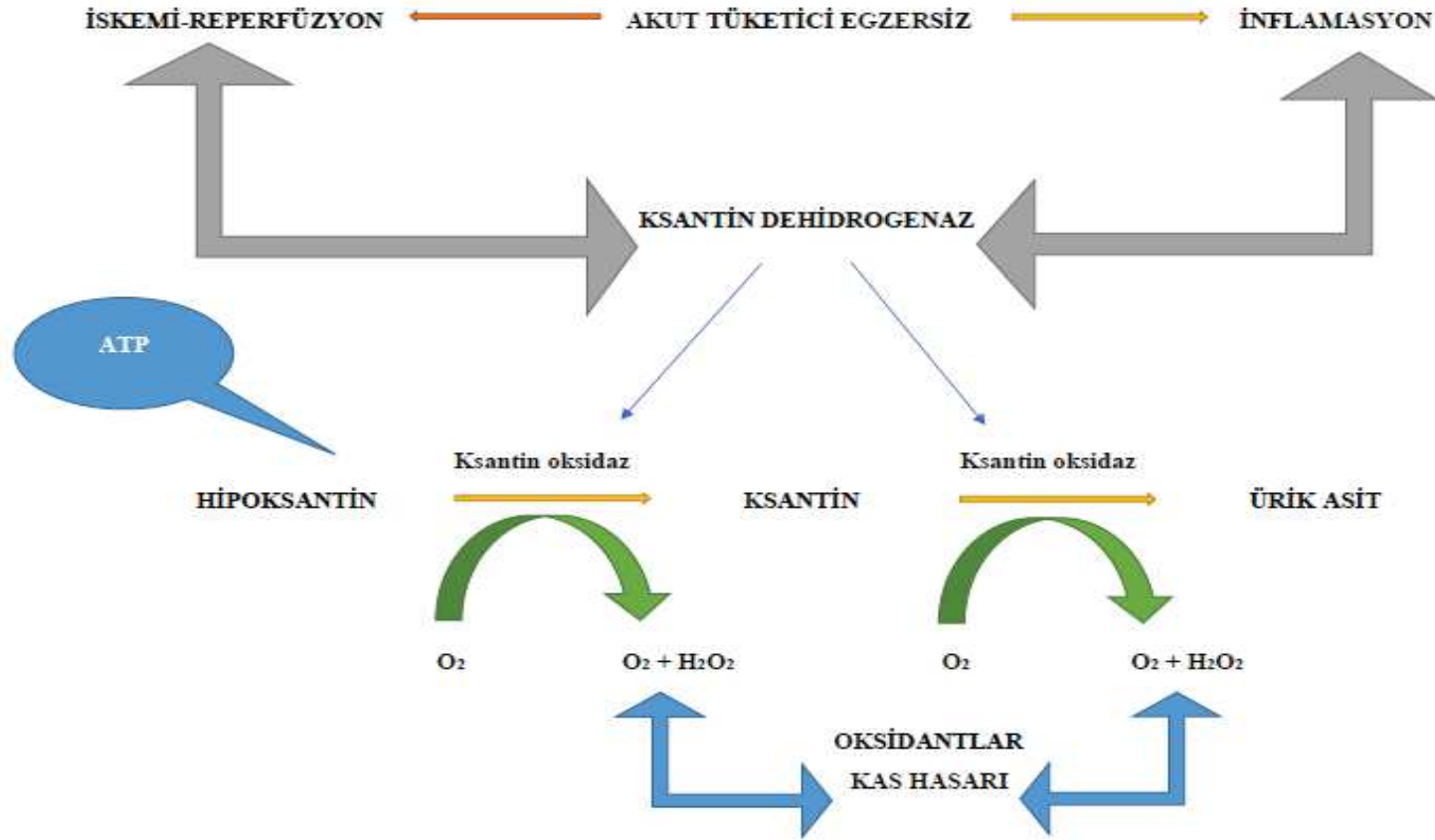
Antioksidan üretiminin azalması ve lipit peroksidasyonunun artmasının kalp hasarı ile ilişkilendirildiği hayvan çalışmaları bulunmaktadır (Chicco ve ark., 2006; Kim ve ark., 2006).

Oksidatif metabolik özelliklere sahip diğer çizgili kaslara kıyasla, miyokardiyumun antioksidan savunma sistemi daha zayıftır (Kumar ve ark., 2013). Kalpteki bazal metabolizma hızının yüksek olması oksidatif hasar riskini artıran bir diğer faktördür (Kumar ve ark., 1992).

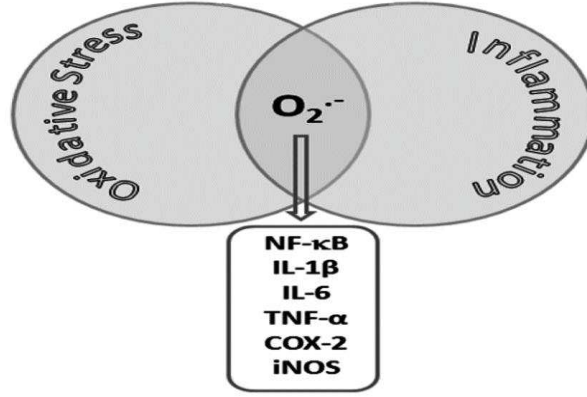
Oksijen tüketiminin artması, reaktif oksijen/nitrojen türlerinin üretimi kalbin reaktif oksijeni nötröle etme yeteneğini sınırlandırır ve böylelikle kardiyak dokuda antioksidan potansiyel azalır (Wonders ve ark., 2007).

Oksidatif stres, inflamatuvar reaksiyona katılan farklı mediyatörlerin salınımıyla ilişkilendirilir. Akut egzersiz proinflamatuvar sitokinler ve adezyon molekülleri gibi inflamatuvar hasar mediyatörlerinin artışına neden olur (Garcı'a-Mediavilla ve ark., 2007; Kretzmann ve ark., 2008).





**Şekil 5.** Akut yoğun egzersizin kalp kası üzerine etkilerini gösteren bazı moleküler mekanizmalar (Juana ve ark., 2015).



**Şekil 6.** Akut yoğun egzersize bağlı oksidatif stresin ve inflamasyonun miyokart hasarı oluşturma mekanizmasının farklı bir gösterimi (Gomez-Cabrera ve ark., 2005).

### 2.3. TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR-ALFA (TNF- $\alpha$ )

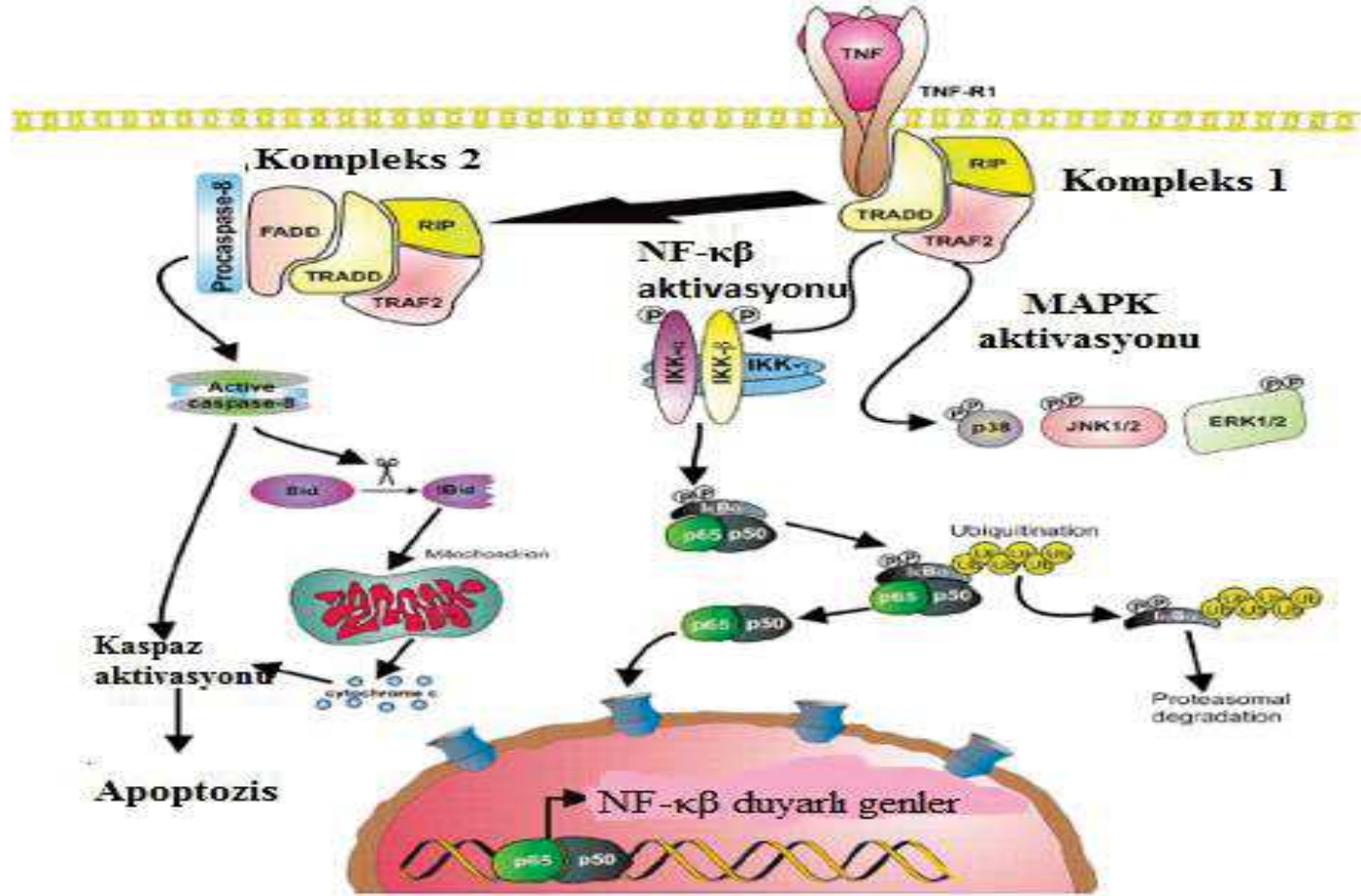
TNF- $\alpha$ , immünoinflamatuvar reaksiyonlarda düşük konsantrasyonlarda ( $10^{-9}$  M) bile güçlü parakrin ve otokrin düzenleyicidir. Aynı zamanda birçok hücre tipinde büyüme ve farklılaşmayı da düzenler. Bir proinflamatuvar sitokin olan TNF, programlanmış hücre ölümü, proliferasyon ve inflamasyonu da içeren birçok farklı fizyolojik süreçte anahtar rol oynar. TNF'in buradaki pleiotropik ve biyolojik etkileri hücreler arası farklı sinyal yollarını aktive etmesinden kaynaklanır. TNF- $\alpha$  hücre içi yangısal işlevler üzerine olan etkilerini TNFR 1 reseptörüne bağlanarak ve böylelikle hücre içerisinde RIP, TRADD ve TRAF2'den oluşan Komleks I'in ortaya çıkmasını uyarak gerçekleştirir (Micheau ve Tschopp, 2003).

Burada ortaya çıkan kompleks 1, NF- $\kappa\beta$ 'nin aktivasyonuna neden olan bir transdüksiyon sinyali başlatır. Kısacası, sitoplazmada NF- $\kappa\beta$ 'ye aktifken bağlanabilen inaktif haldeki I $\kappa\beta$ 'nin inhibitörünü fosforile eden I- $\kappa\beta$  kinaz (I $\kappa\kappa$ )'nın aktive olmasıyla  $\kappa\beta$  serbest kalır ve nükleer faktöre bağlanarak aktif hale gelir. Aktif NF- $\kappa\beta$  nükleusta TNF- $\alpha$  oluşumunu uyarır. Ayrıca NF- $\kappa\beta$  aktivasyonu, kompleks 1'den uyarılmış TNF sinyali c-jun aktive eden kinaz (JNK), ekstrasellüler düzenlenmiş kinaz (ERK), mitojenle etkileşen protein kinaz (MAPK) ve mitojen aktive eden protein kinaz p38'in aktivasyonuna neden olur (Beyaert ve ark., 2002).

Uyarılmış TNF sinyali Fas ilişkili ölüm domaini (FADD) ve kaspaz 8 oluşumunu destekleyerek kompleks 2 oluşumuna da neden olur (Micheau ve Tschopp, 2003). Yukarıdaki yolaktan farklı olarak bu yolakta kaspaz 8 etkindir. Aktif hale gelen bu kaspaz-8, Bid'i (proapoptotik) ayırarak apoptozisi düzenler. Bunun sonucunda tBid (kırılmış Bid-ayrılmış), mitokondryial dış membranın geçirgenliğine neden olan bölgeye bağlanır. Böylelikle hücre ölümüne neden olan diğer kaspazların başka mitokondriyel apoptogenetik faktörlerin ve sitokrom c'nin salınımına neden olur (Beyaert ve ark., 2002).

Yapılan çalışmalar, TNF- $\alpha$ 'nın akut inflamasyonda ve antitümöral immünitede çok önemli bir sitokin olduğunu göstermektedir. TNF- $\alpha$ , nötrofil ve endotel hücrelerini uyararak adezyon ve kemotaksisi yönetir. Bu etkileri ortaya çıkaran TNF- $\alpha$ , aktive monositler, makrofajlar, aktive T hücreleri, B hücreleri, mast hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, kupfer hücreleri, düz kas hücreleri ve bazofil gibi birçok farklı hücre tipinden salgılanmaktadır (Kuralay ve ark., 2006).

Birçok farklı dokuyu etkileyen TNF- $\alpha$ , kalp kasını da etkilemektedir. Nitekim TNF- $\alpha$  miyokardın kasılabilirliğini azaltarak doku perfüzyonunu bozulmasına yol açar. Bu etkisini NO üzerinden gösterir ve kardiyak miyositteki NOS'u aktive ederek argininden, sitrülün ve NO oluşmasını sağlar. Oluşan NO'da miyokart kasılabilirliğini azaltır. TNF aynı zamanda, damar düz kaslarını gevşeterek kan basıncını ve doku perfüzyonunu azaltır. Bu özelliklerini düz kas hücrelerini doğrudan etkileyerek gösterebildiği gibi, damar endotel hücreleri tarafından salgılanan prostasiklin ve NO gibi damar genişleticileri uyararak dolaylı yoldan da gösterebilir (Vasalli P 1992; Farrar ve Schreiber, 1993; Abbas ve ark., 1994; Nororiha ve ark., 1995).



Şekil 7. TNF'in programlanmış hücre ölümü, proliferasyon ve inflamasyon içeren fizyolojik süreçlerdeki rolünün şematize edilmesi (Wullaert ve ark., 2006).

## 2.4. NÜKLEER FAKTÖR KAPPA $\beta$ (NF- $\kappa\beta$ )

NF- $\kappa\beta$ ; inflamasyon, immün yanıt, sitokin/kemokin üretimi, apoptozis ile hücre büyümesi ve gelişimini içeren birçok hücreyel işlevi etkileyen bir redox transkripsiyon faktörüdür (Gilmore 2006).

Omurgalılarda NF- $\kappa\beta$ ; p50 (NF- $\kappa\beta$  1), p52 (NF- $\kappa\beta$  2), p65 (RelA), RelB ve c-Rel olmak üzere beş alt ünite içeren homodimer ve heterodimerlerden oluşur. Uyarın çeşidine bağlı olarak NF- $\kappa\beta$  üç farklı yolla aktive edilebilir. Bunlar;

1. Klasik yol (cononical pathway),
2. Alternatif yol (non-cononical pathway),
3. DNA hasarı sonucu devreye giren yollardır.

Klasik yolak, inflamasyon düzenlenmesi için lenfoid hücrelerin yıkımından ve çoğalmasından sorumludur (Hoffman ve Baltimore, 2006). p50/RelA dimeri bu yolda oluşur. NF- $\kappa\beta$  dimeri (p50/RelA) normalde I $\kappa\beta$  adı verilen inhibitör proteine bağlı olduğundan DNA'ya bağlanamaz. İnaktif durumdaki dimerler pro-inflamatuvar sitokinler (TNF-  $\alpha$  gibi) ya da lipopolisakkaritler tarafından uyarılır. İnhibitör proteine bağlı dimerler bir enzim olan I $\kappa\kappa$  tarafından fosforillenerek ubiquitin proteozom aracılığı ile degradesyonu gerçekleşir. NF- $\kappa\beta$  serbest kalır ve çekirdeğe lokalize olur (Calzado ve ark., 2007).

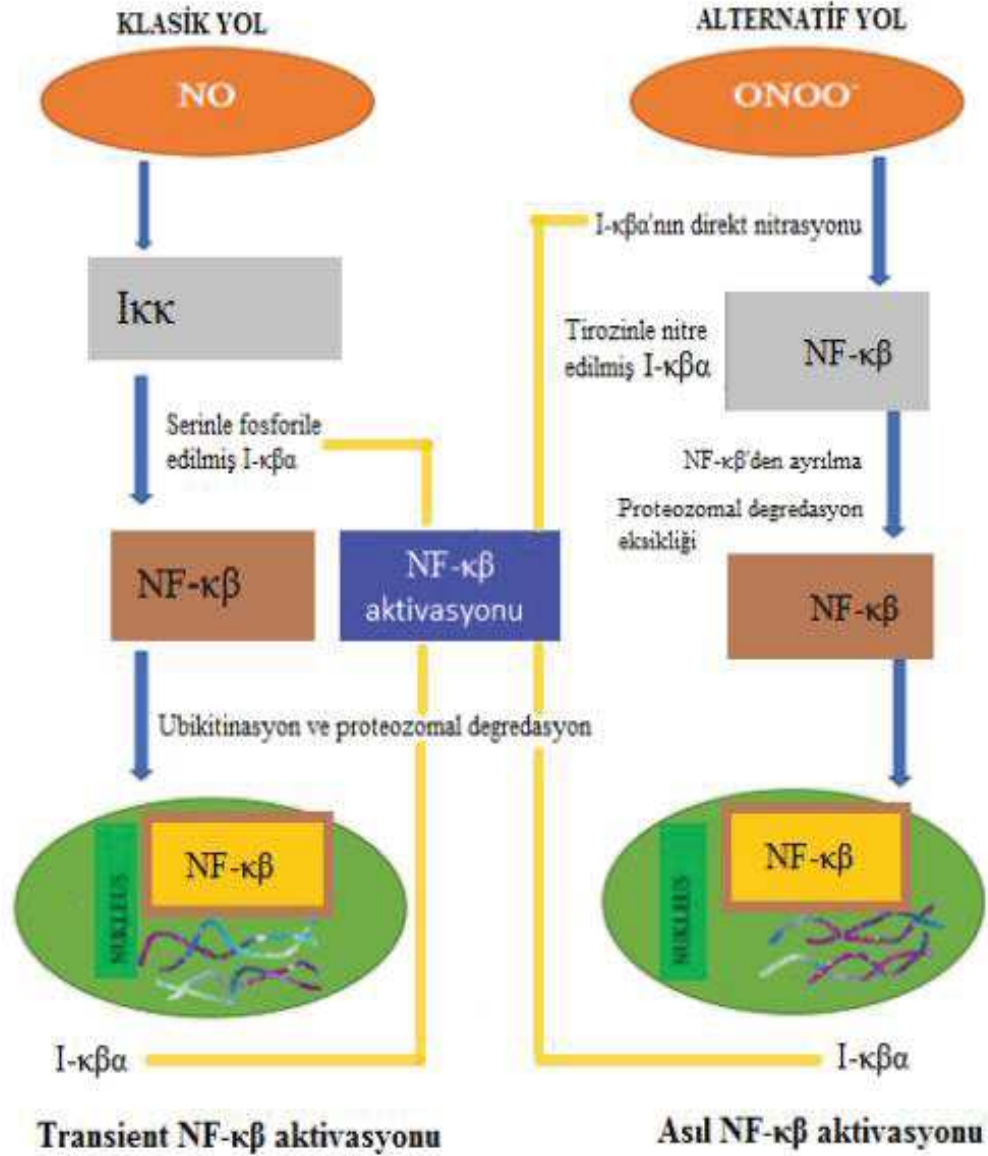
Alternatif yolda ise p52/RelB dimeri aktive olur. Bu yolak geleneksel yola göre daha yavaştır. Bu nedenle p52/RelB dimerinin aktivitesi daha geç gerçekleşir ancak daha uzun sürer. Normal şartlarda, sitoplazmada inaktif olarak bulunan p100/RelB dimeri, lenfotoksin  $\beta$ , CD 40 ve B hücre aktive edici faktör (BAFF) ligandlarıyla uyarılır (Calzado ve ark., 2007; Hoffman ve Baltimore, 2006). p52'nin öncülü olan p100, I $\kappa\kappa$  tarafından fosforlanır. Bu fosforilasyonun sonucu olarak p100, p52'ye dönüştürülür. p52/RelB aktif hale gelir ve nükleer lokalizasyonunu gerçekleştirir (Lindström ve Bennett, 2005; Hoffman ve Baltimore, 2006; Calzado ve ark., 2007).

Üçüncü yolda ise I $\kappa\kappa$ 'ya ihtiyaç yoktur. DNA hasarına karşı bu yolak oluşur.

Her üç yolak da NF- $\kappa\beta$ 'nin nükleusa lokalize olmasını uyarın molekül olarak bilinen nükleer lokalizasyon sinyal domainin (NLS) uyarılmasına yol açarak I $\kappa\beta$ 'den NF- $\kappa\beta$  dimerlerinin ayrılmasına neden olur.

Pro-inflamatuvar sitokinler, virüsler ve TLR aktivasyonu klasik yolu uyaran faktörler olarak bilinir (Gilmore ve ark., 2012).

NF- $\kappa$ B, kardiyak stres durumunda hızlı bir şekilde eksprese edilir (Ao ve ark., 2007). Kalp kasında, egzersizden sonraki 2 saatte NF- $\kappa$ B aktivasyonunda artış olduğu görülmüştür (Balan ve Locke, 2010). Hücrenin inflamasyona verdiği yanıtta TNF- $\alpha$  apoptozisi uyarırken, NF- $\kappa$ B ise apoptozisi baskılar (Yıldırım ve ark., 2010).



Şekil 8. NF- $\kappa$ B'nin klasik yol ve alternatif yol ile uyarılmasının şematik gösterimi.

## 2.5. KARDİYAK TROPONİN I (cTnI)

Troponinler, tropomiyozin ile birlikte iskelet ve kalp kası kasılmasının düzenlenmesinde rol alan yapısal proteinlerdir ve kas proteinlerinin %5'ini oluştururlar.

Troponin T, I ve C'den oluşan troponin kompleksi, aktin ve miyozinin kalsiyum aracılığı ile etkileşimini sağlamakta ve ince filamentlerde yer almaktadır (Jaffe 1999; Sheehan ve Vasikaran, 2001). Buradaki proteinler, iskelet kası ve kalp kasının miyofibrillerinin içine lokalize olur ve farklı genler tarafından kodlanırlar. Genler, miyozin ile aktinin etkileşiminde anahtar rol oynarlar (Mair ve ark., 1992).

Kardiyak troponinler kalp kası hasarının duyarlı ve özgül belirteçleri olarak kabul edilirler. Miyokardiyal hasardan sonra kanda bu proteinlerin düzeyinde artış meydana gelir. Miyokardiyal hasar sonrasında troponinlerin salgılanma mekanizması iki şekilde açıklanabilir;

1. Düşük miyokardiyal hasara bağlı olarak membranın bütünlüğünün bozulması ve sitozolik kısımdan troponinlerin geçici olarak hücre dışına sızması,
2. Yüksek kardiyak hasarlarda proteolitik enzimlerin aktivasyonu ile kasılabilir yapının çözünmesi (Ishikawa ve ark., 1997; Ooi ve ark., 2000).

Kalp kası hasarı olan hastaların yaklaşık olarak % 49'unda troponin seviyelerinin yüksek olması; inflamatuvar mediyatörlerin salınımı, oksidatif stres, renin-angiotensin sisteminin aktive olması, sempatik uyarı ve duvar geriliminin fazla olması gibi çoklu mekanizmalarla ilişkilendirilir. Troponin seviyelerinin arttığı hastaların % 28'inde taşikardi, % 10'unda perikarditis, % 5'inde kalp hasarı gözlemlenmişken % 10'unun ise yoğun egzersize maruz kaldığı belirlenmiştir (Bakshi ve ark., 2002).

İnsanlarda yapılan birçok çalışmanın yanı sıra yapılan birçok deneysel hayvan çalışmasında da uzatılmış yorucu egzersizden sonra miyokart infarktüsünün düzeyini klinik olarak ortaya koymak için serum kardiyak troponinlerinin artmış kan seviyelerinden faydalandığı belirtilmiştir (Shave ve ark., 2007; Scharhag ve ark., 2008).

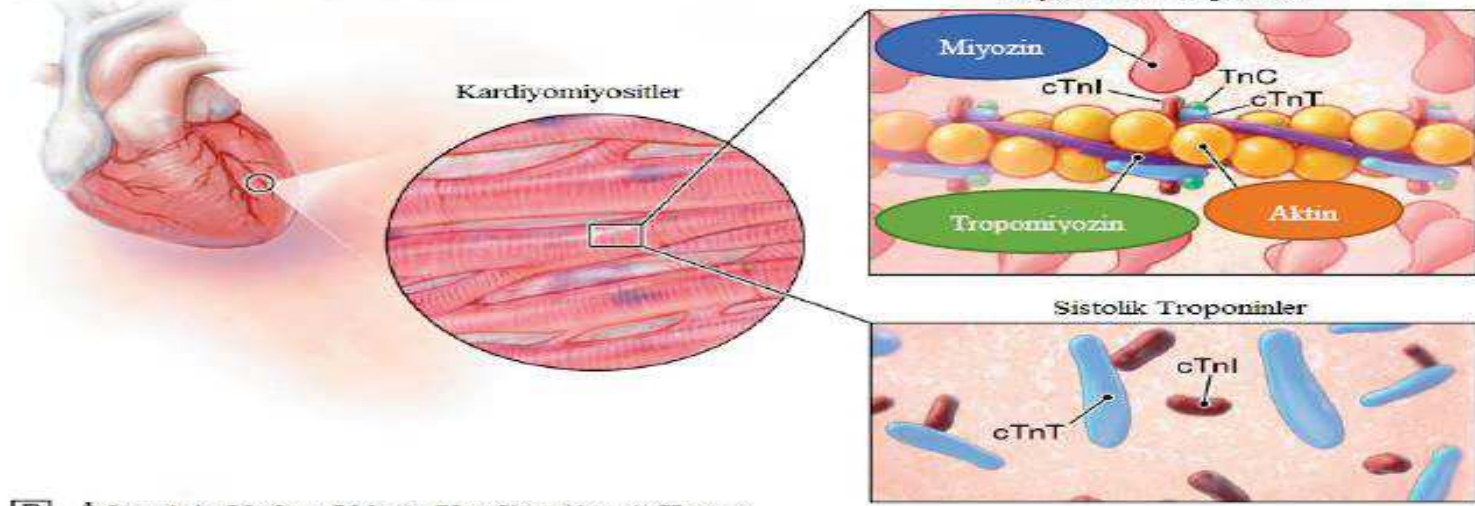
Sağlıklı atletlerde egzersize bağlı olarak, sitoplazmadaki serbest cTnI''nın geçici salınımı ile kalp kası hücrelerinin membran geçirgenliğinde geri dönüşümlü artış olabilir. Geri dönüşümlü olan bu membran sızıntısı cTnI ve cTnT arasındaki erken ve geç salınım potansiyelinden dolayı farklı açıklanabilir. Egzersiz sonrası küçük molekül olan cTnI salınımının cTnT'ye göre daha fazla olduğu görülmüştür (Scharhag ve ark., 2008).

Kalpte iskemik hasardan sonra cTnI' serumdaki seviyesi artar. Melatonin infarktın şiddetini azaltır. Kalp dokusundaki bu koruyucu etkisini ise nötrofil inhibisyonu ve kuvvetli bir antioksidan olması ile gösterir (Dwaich ve ark., 2016).

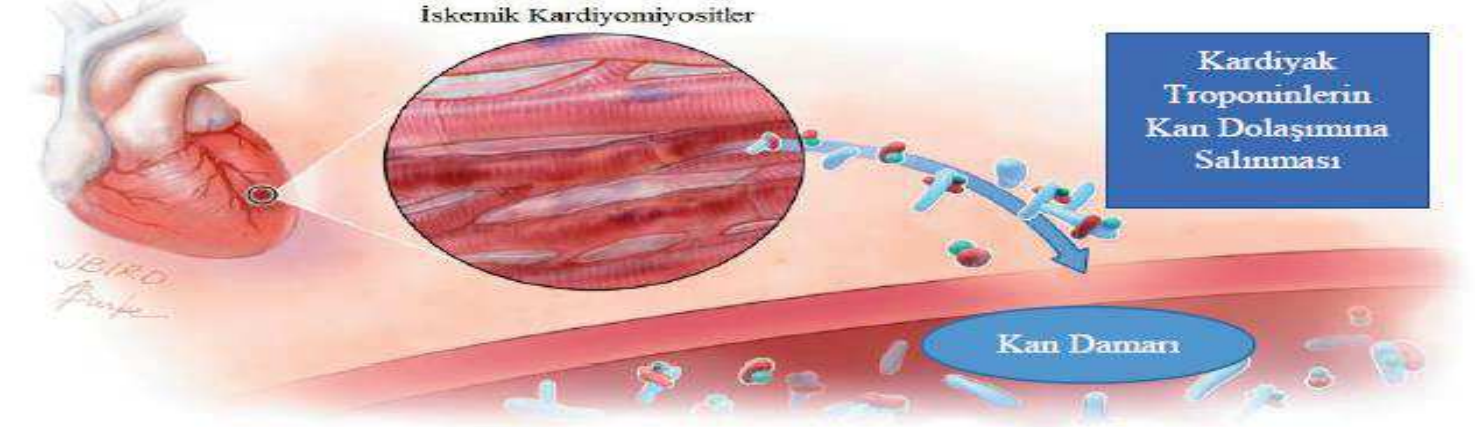




**A** Kardiyak Troponinlerin Yapısı



**B** İskeminin Neden Olduğu Kardiyomiyosit Hasarı



Şekil 9. Kardiyomiyositlerden kardiyak troponin I salınımı (Lemos 2013).

## 2.6. KREATİN KİNAZ- MİYOGLOBİN B (CK-MB)

Kreatin kinaz (kreatin fosfokinaz olarak da bilinir) çizgili kas ve kalp kasında taşıma veya kasılma sistemlerindeki ATP'nin yenilenmesinden sorumlu bir enzimdir. Her kontraksiyon döngüsünde kreatin fosfat yeniden ATP oluşturur. Bu durum kasın ATP düzeyini sabit tutar. Geri dönüşümlü olan bu reaksiyonda CK katalizör olarak yer alır (Murray ve ark., 1998).

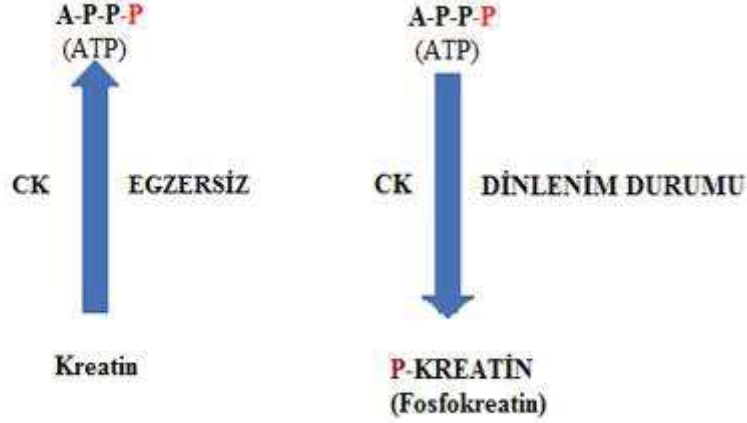
Kreatin kinaz CK-MM, CK-BB ve CK-MB olarak üç farklı izoenzim yapıya sahiptir. Buradaki izoenzimler sitozolde bulunur, mitokondrinin içi ve dışındaki yüksek enerjili fosfatların çıkışını kolaylaştırır (Pant ve ark., 2012).

Kreatin kinazın CK-MM ve CK-MB izoenzimi özellikle miyokardiyumda yüksek düzeylerde bulunur ve miyokardiyal hücre duvarı hasarı için spesifik bir belirteçtir (Walker ve ark., 1990). Hipoksiye veya başka nedenlere bağlı kalp kası hasarlarında hücre membranı bozulması sonucunda CK sistemik dolaşıma salınır (Sobel ve ark., 1975).

CK-MB'nin plazmadaki artışı miyokardiyal infarktüstten farklı olarak bir grup klinik çalışmalarda da rapor edilmiştir. Bunlardan bir tanesinde maraton koşucularında kan CK-MB seviyelerinde artışlar tespit edilmiştir. Yine akut yoğun egzersiz yapan sporcularda da egzersiz sonrası CK-MB düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. Egzersiz sonrası CK-MB düzeylerindeki artışın miyokardiyal hasarın bir göstergesi olduğu düşünülmüştür (Miller ve ark., 1989). Deneysel bir çalışmada ise, tüketici egzersiz ve sürekli eğitim programı köpeklerde kalp kası ve diğer kas gruplarından salınan biyobelirteç düzeyinin etkilendiği belirlenmiştir (Cerqueira ve ark., 2018).

Melatoninin kalp kası üzerine koruyucu etkileri CK-MB üzerinden de gösterilmiştir. Nitekim serbest radikal süpürücü olarak bilinen melatoninin, kalp kası hücresi içerisinde oluşan serbest radikalleri azaltarak CK-MB salınımını azaltır (Zhou ve ark., 2018). Tavşanlarda yapılan bir çalışmada, hipoksi oluşturulan grupta çalışma sonunda CK-MB düzeylerindeki artış, literatürdeki veriler ile bağdaşmaktadır. CKMB düzeyindeki bu artış gruplarda hipoksi ve miyokardiyal hasarın meydana geldiğini göstermiştir.

Çalışma sonunda melatonin uygulaması yapılan grupta ise CKMB seviyelerinde yükselmenin olmaması bu grupta miyokardiyal hasarını önlediğini göstermektedir. Oluşan küçük çapta miyokardiyal hasarın saptanmasında ise serum CKMB düzeylerinin yeterli olmadığını belirlenmiştir (Narin ve ark., 2004).



Şekil 10. Egzersiz ve dinlenme durumunda CK ve ATP yenilenme mekanizması.

## 2.7. ISKEMİ MODİFİYE ALBUMİN (IMA)

Akut iskemik durumlar kalp kasında birçok değişikliğe neden olabilir. Bu değişiklikler çoğu zaman kalbin pompalama yeteneğini etkileyeceğinden hayati önem taşır. Bu nedenle kalp kasındaki iskemik durumların zamanında tespit edilmesi önem arz etmektedir. Günümüzde bu amaca yönelik çalışmalar devam etmekte olup son yıllarda IMA bu amaçla kullanılabilir belirtiçlerden biri olarak dikkat çekmektedir.

IMA üretim mekanizması henüz bilinmemekle beraber albuminin N-ucundaki modifikasyon miyokardiyal iskemi-reperfüzyonda üretilen ROS'la ilişkilendirilir. Akut iskemik durumlar albumini, iskemi modifiye albumin olarak bilinen proteine dönüştürerek demir, nikel ve kobalt gibi geçiş metallerin bağlanma kapasitesini azaltır. Reaktif oksijen türleri ve iskemi-reperfüzyon, albuminin N-ucunda modifikasyona neden olarak serbest hidrojen üretimine neden olur. ROS'un insan serumundaki albumini değiştirerek IMA üretimine neden olduğu bilinmektedir (Ramasamy, 2011).

IMA'nın hücre içinde üretilmesi kalp kası hücresindeki nekrozun boyutunu sınırlandırıp, kalp kası hasarını önleyerek iskemi için etkili bir endojen mekanizma olarak yorumlanabilir. Akut iskemide olduğu gibi albuminin geçiş metallerine afinitesinin azalması sonucu aktif kobaltın plazmadaki konsantrasyonundaki yükselme iskemi-reperfüzyon hasarını sınırlandıran IMA artışına neden olur (Sinha ve ark., 2004).

IMA infarktüste ilerleyişin önlenmesi ve kardiyak hastalıklarda geçici olmayan kalp hasarının başlangıcından önce iskeminin değerlendirilmesi için yararlıdır. İskemiye erken saptayabildiği, ucuz ve duyarlı olduğu için IMA kullanımı yaygınlaşmaktadır. IMA iskeminin başlangıcından hemen dakikalar içerisinde yükselir ve 6-12 saat kadar yüksek kalır. Ayrıca IMA'nın miyokard iskemisini gözlemlenmede CK-MB'den daha faydalı olacağı belirtilmektedir (Can ve Yosunkaya, 2017).

## **2.8. PROKALSİTONİN (PCT)**

Prokalsitonin, kalsitonin hormonunun bir prohormonu olarak ilk kez 1986 yılında Ghillani ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Prokalsitonin, 116 amino asitten oluşan bir proteindir ve tiroid bezinde parafoliküler C hücrelerinden sentezlenen kalsitoninin prohormonu olarak kabul edilmektedir (Oczenski W, Fitzgerald RD ve Scwarz S., 1998; Maisner 2000).

PCT sentezi öncül protein olan preprokalsitonin translasyonu ile başlar. PCT'nin N-ucunda (N-ProCT), kalsitonin ve PCT'nin C-ucunda (katakalsin) olmak üzere iki bölgesi bulunmaktadır. Proteolizle ilk olarak PCT ve daha sonra kalsitonin hormonu açığa çıkar (Maisner 2000; Gendrel ve Bohuon, 2000).

PCT otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda monitörize etme, hastalığı önleme ve tanı koymada önemli bir gösterge olarak önerilmektedir. PCT'nin hipotalamo-hipofiz aksı ile ilişkili olduğu ve nöronal, hormonal ve biyolojik aktiviteleri ile çok yönlü bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (Ojeda ve ark., 2006).

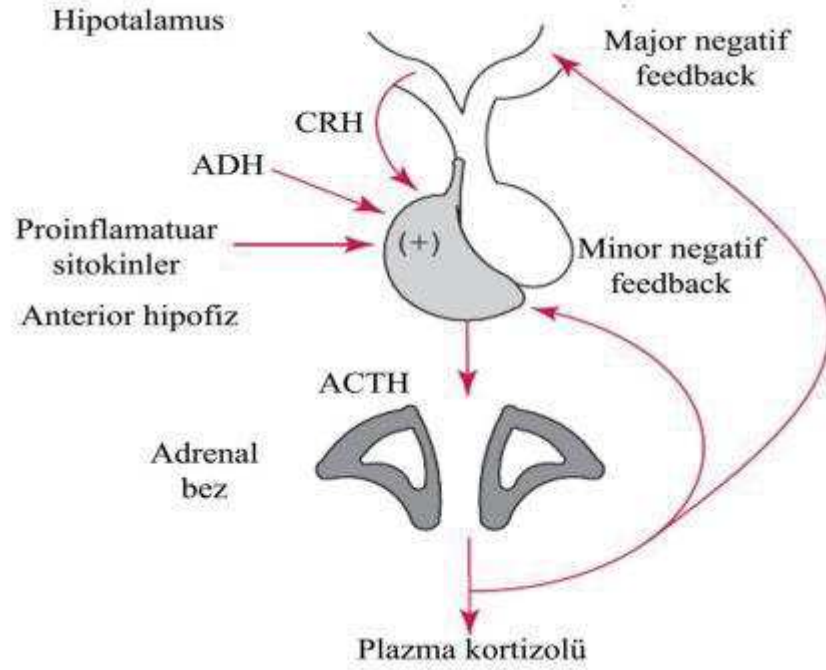
Serumda meydana gelen PCT seviyesindeki artış sadece bakteriyel enfeksiyonun varlığında değil aynı zamanda bu artışa değil aynı zamanda sistemik inflamasyon kaynaklı da olabileceği düşünülmektedir. Çünkü PCT salınımı TNF- $\alpha$  aracılığı ile de uyarılabilir (Papassotiriou ve ark., 2008).

Prokalsitonin ilk keşfedildiği yıllarda enfeksiyon ilişkili bir molekül olarak belirlenmesine rağmen son yıllarda kalp hastalıkları ile de ilişkilendirilmiştir. Bir akut faz proteini olan PCT'nin, kalbin durması durumunda oluşan metabolik dengesizliğin hassas inflamatuvar bir göstergesi olduğu belirtilmiştir (Krzych ve ark., 2017). Nitekim kalp hasarı olan ancak enfeksiyon bulunmayan hastalarda kontrol grubundaki insanlara göre PCT düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. Daha da önemlisi bu artış kısa süreli mortalite ile ilişkilendirilmiştir (Aissou ve ark., 2018).

Benzer şekilde yapılan deneysel çalışmalarda da benzer bulgular elde edilmiştir. Bakteri enfeksiyonunun olmadığı birçok durumda PCT serum düzeylerinde artış görülmektedir. PCT seviyelerinin tamam olarak etkilendiği iki yaygın durum vardır. Bunlar; konjesif kalp yetmezliği ve renal fonksiyon bozukluğudur. İnsanlarda yapılan sınırlı çalışmalar sonucunda bakteriyel enfeksiyondan farklı olarak konjesif kalp yetmezliği ve renal fonksiyon bozukluğunda PCT düzeylerinin kullanımı desteklenmiştir (Covington ve ark., 2018).

## **2.9. KORTİKOSTERON (CORT)**

Kortikosteron böbrek üstü bezinin korteksinden strese yanıt olarak salgılanan glikokortikoid yapıda bir hormondur. Organizmanın strese fizyolojik yanıtı iki aşamalı olarak gerçekleşir. İlk olarak, sempatik sinir sisteminin uyarılması ile dolaşıma katekolaminler salınır. Strese yanıtın ikinci aşamasında ise hipotalamus-hipofiz-adrenal (HHA) aks aktive olur. Birçok endokrin sürecin aktivasyonunu içerdiği için bu aşama ilk aşamaya göre daha yavaş gerçekleşir. İkinci aşamadan sonuç olarak dolaşıma glukokortikoid hormonlar (insanda kortizol, sıçanda kortikosteron) salgılanır (McCormick ve ark., 2010).



**Şekil 11.** Kortizol salınım mekanizması (Burtis ve ark, 2012).

Fizyolojik stres durumunda, plazmada adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve kortizol düzeyleri artar. Uyarı merkezi sinir sistemi yolu ile hipotalamustan kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) salgılanması ile başlar. Salgılanan CRH ise hipofizden ACTH salgılanmasını uyarır (Greenspan ve ark, 2004).

HHA aksinin düzenlenmesinde immun sistem de etkilidir. Sistemik enfeksiyonlar ve inflamatuvar mediyatörler HHA aksını aktif hale getirerek, kortizol salınımını artırır (Turnbull ve ark, 1999).

Kortikosteron, proinflamatuvar sitokinlerin üretimini baskımlarken antiinflamatuvar sitokinlerin üretimini artırır. Periferik dolaşımdaki nötrofil sayısını kemik iliğinin uyararak artırsa bile, lökositlerin hasarlı bölgeye migrasyonunu, fagositik aktivitesini ve genel olarak hücrel immüniteyi baskılar. Kortikosteron salınımının miktarı sirkadiyen ritme göre ayarlanmakta ve düzenlenmektedir (Demir ve Tüfekçioğlu, 2008).

Yoğun egzersizin HHA aksisini aktive ederek CORT salgılanmasını uyarıcı bir etki gösterdiği bilinmektedir. Öncesinde eğitim olsun ya da olmasın yüksek yoğunlukta fiziksel egzersize maruz bırakılan sıçanlarda CORT düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. (Lotzerich ve ark., 1990; Ortega ve ark., 1996).

Tüketici fiziksel aktivite ya da öncesinde eğitim olmadan yapılan akut fiziksel aktivite çalışmalarında CORT seviyelerinde artış olduğu saptanmıştır. Günümüzde yapılan çalışmalarda eğitilmiş yüzücülerdeki CORT düzeyleri akut olarak yüzdürülenlere göre daha düşük bulunmuştur. Sıçanlarda akut yüzücülerdeki CORT düzeyleri eğitilmiş yüzücü sıçanlarla karşılaştırıldığında 1,5 kat daha yüksek olduğu saptanmış ve dinlenimden sonra ise daha düşük seviyede olduğu görülmüştür (Salmana ve ark., 1999).

Yoğun egzersiz uygulaması olarak; yüzme egzersizi, çark koşusu ya da treadmill gibi uygulamalar yapılabilir. Bu tip egzersizler organizmada kalp hızı, oksijen tüketimi, sempatik sinir sistemi aktivitesi ile insülin ve glukagon salınımında artış gibi bir takım akut etkiler oluştururlar. Egzersiz süresince kullanılan kas kitlesi oranına göre enerji harcanması da artar. Bütün bu faktörler sonuç olarak CORT salınımında da artışa yol açarlar (Hare ve ark., 2014).

## **2.10. TOLL LİKE RESEPTÖR 4 (TLR 4)**

TLR'ler makrofaj ve dendritik hücreler tarafından eksprese edilen tip 1 transmembran proteinleridir ve üç bölümden oluşurlar. Bunlar; transmembran heliks bölümü, bağlanma bölgelerinin tanınmasından sorumlu olan ekstraselüler kısım ve sinyal yolaklarının başlangıcı olan intraselüler toll-like/interlökin-1 reseptörüdür (TIR; Nomura ve ark., 1994; Taguchi ve ark., 1996).

TLR'ler son yıllarda hücrelerde yangısal süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir molekül olarak dikkat çekmektedir. İmmün yanıtın ilk basamağında TLR'lerin rol oynadığı belirtilmektedir. TLR kökenli uyarılar çoğunlukla, hücre ölümü ve yaşamı, immün ve inflamatuvar yanıtlar içeren başlıca genlerin düzenlenmesinde önemli rol oynayan NF- $\kappa$ B yolağını aktive ederler (Faure ve ark., 2001).

TLR'ler için tanımlanan bağlanma bölgeleri sadece savunma yanıtı ve TLR aktivasyonu için değil, birçok inflamatuvar sürecin oluşmasında da etken rol alırlar. TLR'ler enfeksiyonlarla ilişkilendirilmesine rağmen son yıllarda yapılan çalışmalar, iskemi/reperfüzyon ve bakteriyel olmayan durumlarda da TLR2 ve TLR4 aktivasyonunun önemli olduğunu göstermiştir.

TLR'ler etkilerini NF- $\kappa$ B yolağı üzerinden gösterirler. Nitekim TLR-4'ün ekspresyonundaki artışın NF- $\kappa$ B aktivasyonu ve sitokin üretiminde artışa yol açtığı belirlenmiştir. Diğer taraftan insanlarda iskemik kalp hasarında TLR-4 ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Organ nakli, miyokard infarktüsü ve inme gibi durumlarda oluşan iskemi reperfüzyon hasarının TLR4 ve TLR2 bağlı olarak artabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Barsness ve ark., 2004; Wu ve ark., 2007). Oyama ve ark., (2004), miyokard iskemisi ile ortaya çıkan hücrel sinyallerin aktivasyonu için TLR-4'ün gerekli olduğunu belirtmişlerdir

TLR-4 uyarılması doğrudan hücrelerarası sinyal ile başlatılabileceği gibi süperoksit anyonları tarafından dolaylı olarak da başlatılabilir. Örneğin, iNOS artışına sebep olan septik şoklarda TLR-4 aktivasyonu gerçekleşebilir (Cobb 2001). Burada süperoksitlerin TLR-4 ile dolaylı etkileşimi hücrel aktivasyonları başlatır. Başka bir örnekte ise; hemorajik şok durumunda ortaya çıkan hidrojen peroksitin TLR4'ün membran lipidlerine bağlanmasını artırdığı belirlenmiştir (Powers ve ark., 2006). Son yıllardaki çalışmalar ise, ROS'un neden olduğu inflamasyonda diğer TLR tiplerinin de önemli olabileceğini düşündürmüştür (Murray ve ark., 2008; Cavassani ve ark., 2008).

TLR ekspresyonunun egzersizle baskılanma mekanizması henüz tam olarak bilinmemesine rağmen, dolaşımdaki sitokin ve ısı şoku proteinleri (HSPs) seviyelerindeki artış ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Egzersiz sonrasında NF- $\kappa$ B sinyal yolağının uyarılmasına bağlı TNF- $\alpha$  düzeylerindeki artışların TLR ekspresyonunu azalttığı düşünülmektedir (Ostrowski ve ark., 1999; Pedersen ve Saltin, 2006). Egzersiz sonrasında toplana kanda TNF- $\alpha$  düzeyindeki artışın TLR ekspresyonunu sınırlandırdığı düşünülmüştür (Lancaster ve ark., 2005; Gleeson ve ark., 2006).



TLR'ler endojen tehlike sinyalleri olarak da isimlendirilirler. Miyokardiyal iskem/reperfüzyon hasarının sonucunda ortaya çıkan hücre ölümünde de TLR,'lerin aktivasyonunda artış gözlenir. TLR'lerin bu etkilerinin ortaya çıkmasına bağlı olarak koruyucu birtakım ajanların kullanılması gündeme gelmiştir. Bu amaçla kullanılan moleküllerden biri de melatonindir. Yapılan bir çalışmada izole sıçan kalbine iskemik hasardan önce melatonin uygulanmasının TLR-4 sinyalini inhibe ettiği belirlenmiştir. Melatoninin bu etkiyi proinflamatuvar sitokinleri (TNF- $\alpha$  vb.) azaltarak, TLR-4'ün LPS-bağlanma bölgesi ve CD-14 proteini gibi membran dış yüzeyindeki sinyal birimlerini bloke ederek gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Zhou ve ark., 2018).

## **2.11. APOPTOZİS**

Apoptozis, enerji bağımlı bir olaydır ve genlerle düzenlenerek programlı bir şekilde hücrelerin kendi kendilerini yok etmeleriyle homeostatik hücre ölüm şekli olarak bilinmektedir (Kerr ve ark., 1972; Paweletz ve Walther, 2001).

Bir hücre apoptoz uyarısı aldığı zaman ortamından uzaklaşır, komşu hücrelerle bağlantısını koparır, büzülür ve kromatini yoğunlaşır. Organelleri yapısal bütünlüklerini korur. Hücre zarında bulunan fosfolipidlerin hücre zarının dış yüzüne transloke olur. Çekirdek küçülür, parçalara ayrılır. Hücre zarıyla sarılı tomurcuklar halinde kopar, apoptotik cisimciklere ayrılır bu cisimcikler de makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir, fakat inflamasyon görülmez (Ellis ve ark., 1991; Bellamy ve ark., 1995).

### **2.11.1. Apoptoz'un Düzenlenmesi**

Apoptozun düzenlenmesinde; kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler, mitokondriler rol oynar.

Apoptotik süreç süresince hücre içine sürekli olarak kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonlarını kullandığı yerler; endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonu ve gen düzenlenmesi ile hücre iskeleti organizasyonudur (Adams ve Cory, 2001).

### 2.11.2. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi apoptozun düzenlenmesinde önemli role sahiptir ve birbirine zıt 2 gruptan oluşur. Bunlar;

- Proapoptotik grup üyeleri,
- Antiapoptotik grup üyeleridir.

Hücre içerisinde bu moleküllerden hangisinin fazla olduğu apoptoz sürecini belirleyen bir faktördür. Eğer hücre içerisinde proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptotik sürece girmeye yatkın iken antiapoptotik proteinler fazla ise hücrenin apoptoza girme eğilimi azalır (Adams ve Cory, 2001).

Proapoptotik grubun üyesi olarak sitoplazmada bulunan; Bad, Bax, Bid, Puma, BclXs, Bim, Bak ve Noxa gösterilebilir. Proapoptotik üyeler sitokrom-c ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımını artırarak apoptozu uyarırlar.

Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 ise endoplazmik retikulumda, mitokondrinin dış zarında ve çekirdek zarında yer alan antiapoptotik üyelerdir. Por oluşumunu sağlayarak iyon taşınmasını düzenlerler. Hücre içerisindeki  $Ca^{++}$  düzeyinin kontrolünü sağlarlar. Ayrıca kaspazların öncü formlarıyla AIF ve sitokrom-c salınımını bloke ederek apoptozu inhibe ederler (Adams ve Cory, 2001; Adrain ve Martin, 2001; Spierings ve ark., 2004).

### 2.11.3. Kaspazlar

Kaspazlar, sistein proteaz yapısındadırlar ve aspartik asitten sonraki peptid bağımlı kırarlar. Hücrede inaktiftirler, uyarı alındığında birbirlerini aktifleştirirler.

Üç farklı etki tipi vardır:

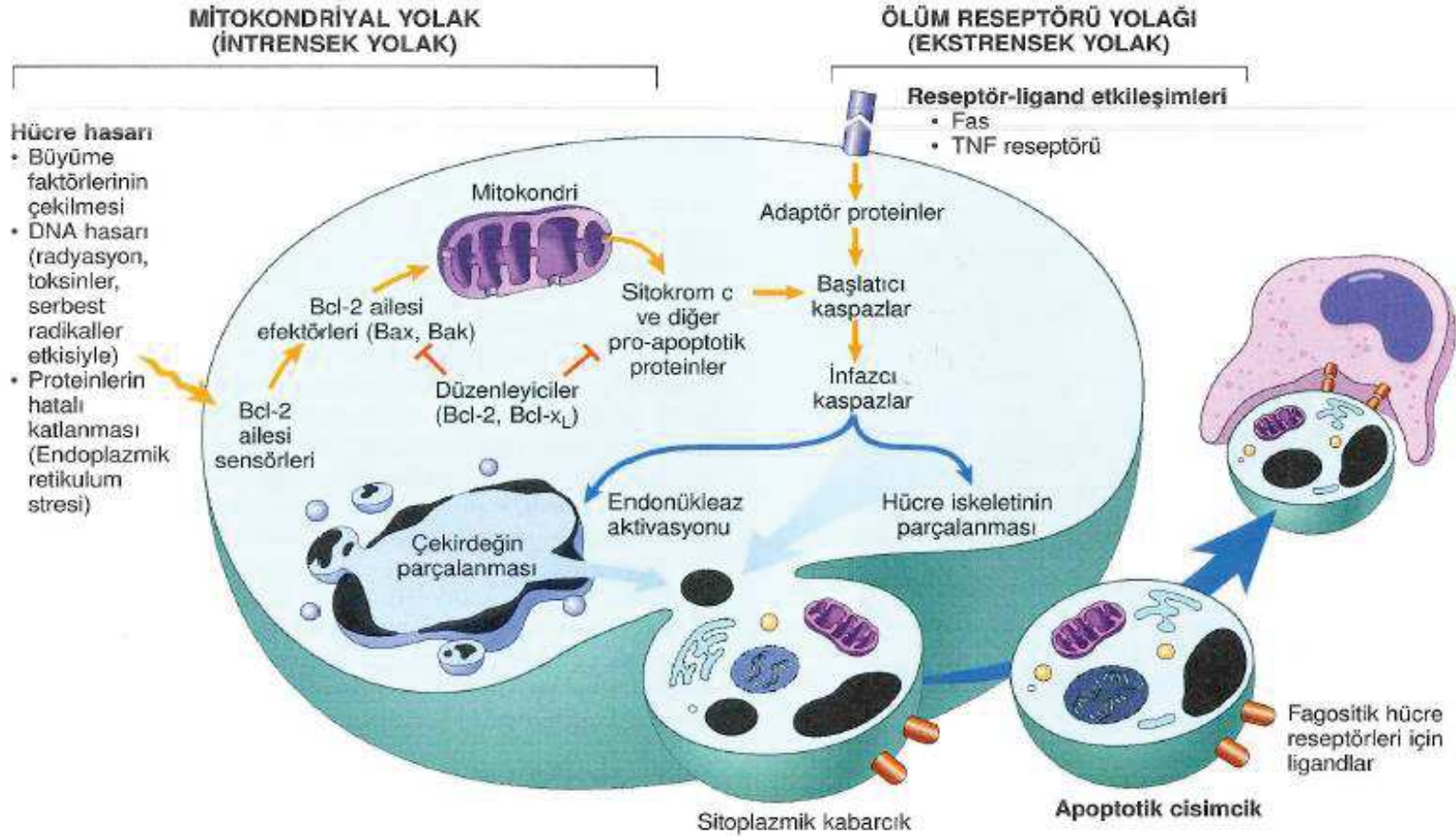
- Başlatıcı kaspazlar; Kaspaz 2,8,9,10
- Efektör kaspazlar; Kaspaz 3,6,7
- İnflamatuar kaspazlar; Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14

Kaspazlar, DNA tamiri ve replikasyonunda görev alan enzimleri inaktive ederler (Adams ve Cory, 2001; Adrain ve Martin, 2001; Spierings ve ark., 2004). Aktiflenen kaspazların bazıları lamin proteinlerini parçalarken bazıları da hücre içi iskelet proteinlerine saldırırlar.

Bir diğerkaspaz da DNaz inhibe eden proteine bağlanıp DNaz'ın serbest kalmasını sağlar böylece serbest DNaz çekirdek DNA'sını parçalara ayırır. Kaspaz zincirinde yer alan enzimler bir kez aktive olduktan sonra geri dönüşü yoktur ve hücreyi ölüme götürürler (Yıldırım ve ark., 2010).

Kaspaz-3 kalp kasında meydana gelen apoptozisin belirlenmesinde önemli bir molekül olarak bilinmektedir. Nitekim oksidatif strese bağlı gerçekleşen mitokondriyal DNA (mtDNA) bütünlüğünün bozulması kaspaz-3 ile ilişkilendirilebilir (Gadaleta ve ark., 1992). Egzersize bağlı gerçekleşen sol ventrikül kas hücre apoptozunda kaspaz-3'ün yanısıra sitokrom-c ve Bax/Bcl-2 oranında artış belirlenmiştir (Le Page ve ark., 2009).

Apoptozis intrinsik ve ekstrinsik olarak iki farklı yolla gerçekleşir. Bunlardan mitokondriyal yolak intrinsik, ölüm reseptörü yolağı ise ekstrinsik yolak olarak bilinir. Bu yolaklarda görev alan moleküller ve yolaklarla ilgili diğerkbilgiler şekil 12' de gösterilmiştir.



Şekil 12. Apoptozisin intrinsik ve ekstrinsik yollarının gösterimi (Kumar ve ark., 2013).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun izni ile yürütüldü (2017/04-13). Çalışmanın hayvan deneyleri kısmı, elde edilen dokulardan RNA izolasyonu, cDNA eldesi, RT-PCR analizi, lökosit sulandırma, lökosit çeşitlerinin ve yoğunluğunun saptanması için Giemsa-May Grünwald ile boyama işlemleri ÇOMÜ Deneysel Araştırmalar Uygulama Ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

#### 3.1. Hayvan Materyali ve Deney Ortamı

Bu çalışmada, Wistar albino türü 2-3 aylık 250-300 gr ağırlığında 35 erkek sıçan kullanıldı. Çalışma için vücut ağırlıklarına göre, her biri 7'şer adet hayvandan oluşan 5 grup oluşturuldu. Deney süresince hayvanlar 12 saat gece 12 saat gündüz döngüsünde,  $22\pm 2$  °C'lik ortam ısısına sahip oda koşullarında barındırıldı. Deney hayvanlarının beslenmesi için standart yem *ad libitum* olarak ve içme suyu ise aydınlık döngüde şebeke musluk suyu olacak şekilde verildi. Karanlık dönemde ise musluk suyu içeren şişeler alındı ve yerlerine her bir grup için aşağıda belirtilen içeriği ihtiva eden şişeler yerleştirildi.

#### 3.2. Grupların Oluşturulması

Gruplar oluşturulmadan önce tüm sıçanlar tartıldı ve ağırlıkları dikkate alınarak her grupta 7 sıçan olacak şekilde 5 grup oluşturuldu. Tüm grupların uygulama süresi 7 gün olarak belirlendi ve çalışma süresince ışıklar 20.00'da kapatılıp 08.00'da açıldı. Böylelikle deney süresince tüm grupların 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda bulunması sağlandı. Sular ışığın açılıp kapanmasına göre değiştirildi.

**Grup 1 (SHAM, n=7):** Bu gruba tüm pinealektomi prosedürü uygulandı fakat pineal bez çıkarılmadı. Çalışma süresince içme sularına 7 gün boyunca 3 ml vehicle (1.5 ml serum fizyolojik + 1.5 ml % 2'lik etanol) eklendi. Egzersizden 30 dakika önce 3 ml vehicle intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi.

**Grup 2 (SHAM+MLT30, n=7):** Bu grupta SHAM pinealektomi operasyonu yapıldı. Sıçanların içme sularına 7 gün 20.00-08.00 saatleri arasında yaklaşık 3 ml/sıçan olacak şekilde vehicle eklendi. Egzersizden 30 dakika önce 10 mg/kg melatonin i.p. olarak enjekte edildi.

**Grup 3 (PLT, n=7):** Bu gruba pinealektomi operasyonu aşağıda belirtilen şekilde yapıldı. Çalışma süresince sıçanların içme sularına 3 ml vehicle eklendi. Egzersizden 30 dakika önce sıçanlara 3 ml i.p. vehicle enjeksiyonu yapıldı.

**Grup 4 (PLT+MLT30, n=7):** Bu gruba pinealektomi operasyonu yapıldı. Çalışma süresince sıçanların içme sularına 3 ml vehicle eklendi. Egzersizden 30 dakika önce sıçanlara 10 mg/kg intraperitoneal melatonin enjeksiyonu yapıldı.

**Grup 5 (PLT+MLT + Vehicle, n=7):** Bu grupta pinealektomi operasyonu yapıldı. Sıçanların içme sularına 7 gün boyunca yaklaşık olarak 10 mg/kg olacak şekilde melatonin eklendi. Egzersizden 30 dakika önce 3 ml vehicle intraperitoneal olarak enjekte edildi (sudaki etanol oranı % 0,0004).

### **3.3. Yöntem**

Gruplara yapılan uygulamalar için gerekli bilgiler aşağıda belirtilmiştir.

#### **3.3.1. Melatonin Uygulaması**

Melatonin, içme suyuna eklenmek ve intraperitoneal olarak uygulanmak üzere iki farklı şekilde ve dozda hazırlandı.

Intraperitoneal uygulama için, melatonin % 2'lik etanol (Absolute GR for analysis, MERCK) içeren 1.5 ml serum fizyolojik (SF) çözeltisi içerisinde çözündürüldü (son etanol konsantrasyonu % 0,01). Elde edilen 3 ml'lik SF-etanol çözeltisini her bir sıçan için 10 mg/kg dozda melatonin olacak şekilde melatonin eklenerek i.p. enjeksiyon yapıldı (Veneroso ve ark., 2009). Bu amaçla, hazırlanan melatonin egzersizden 10 dakika önce hazırlandı ve egzersizden 30 dakika sonra sıçanlara i.p. olarak enjekte edildi.

İçme suyuna eklemek için ise, % 2'lik etanol içeren 1.5 ml serum fizyolojik çözeltisi içerisinde 0.3 mg/kg melatonin çözündürülerek hazırlandı. Bu miktar belirlenirken;

- a) bir sıçana uygulanacak melatonin dozu,
- b) bir sıçanın gece 12 saatte içtiği su miktarı dikkate alındı. Bu amaçla grupların bir gecelik su tüketimleri ölçüldü.

Belirlenen sonuçlara göre her bir hayvan başına 66 ml su olacak şekilde içme suyu suluklara koyuldu (son etanol konsantrasyonu % 0,0004). Bu işlem melatonin verilen gruplara 7 gün boyunca 20:00-08:00 saatleri arasında yapıldı. Sabah 08:00'da melatonin içeren sular alınarak yerlerine musluk suyu konuldu. Melatonin ihtiva eden sular her gün taze olarak hazırlandı.

### **3.3.2. Vehicle Uygulaması**

Vehicle, hem içme suyuna hem de intraperitoneal uygulama için ayrı ayrı hazırlandı. İntraperitoneal uygulama için, 1.5 ml % 2'lik etanol, 1.5 ml serum fizyolojik çözeltisi içerisinde çözdürüldü. İçme suyuna eklemek için ise, 1.5 ml (bir hayvan için çözdürme dozu) % 2'lik etanol içeren 1.5 ml (bir hayvan için çözdürme dozu) serum fizyolojik çözeltisi içerisinde çözdürülerek daha önce bir hayvanın bir gecede tükettiği su miktarı olarak belirlenen yaklaşık 66 ml'lik suya eklendi.

Uygulanacak olan % 2'lik etanol uygulama süresince taze olarak hazırlanmıştı. İçme suyuna vehicle ekleme uygulaması 7 gün süresince akşam 20.00 sabah 08.00 saatleri arasında yapıldı. Enjeksiyon şeklindeki vehicle uygulamalarında ise vehicle egzersizden 10 dakika önce hazırlandı ve egzersizden 30 dakika önce de sıçanlara intraperitoneal olarak enjekte edildi.

### **3.4. Hayvanlar Üzerinde Yapılan Uygulamalar**

Bu çalışmada sıçanlara çalışmanın başlangıcında ilk olarak aşağıda belirtilen prosedüre göre SHAM pinealektomi veya pinealektomi operasyonları yapıldı. Operasyon sonrası sıçanlar post operasyon odasına alınarak bir süre beklendi. Bu sürede sıçanlar yukarıda bahsedilen ortam koşullarında barındırıldı. Operasyonun yapıldığı günün ertesi sabahı çalışmanın 1. günü olarak kabul edildi ve 7. güne kadar melatonin uygulamaları yapıldı. Bunun dışında bir işlem yapılmadı. Çalışmanın 7. gününde tüm işlemlere sabah ışıklar açıldıktan sonra başlandı ve 12.00'da tamamlandı.

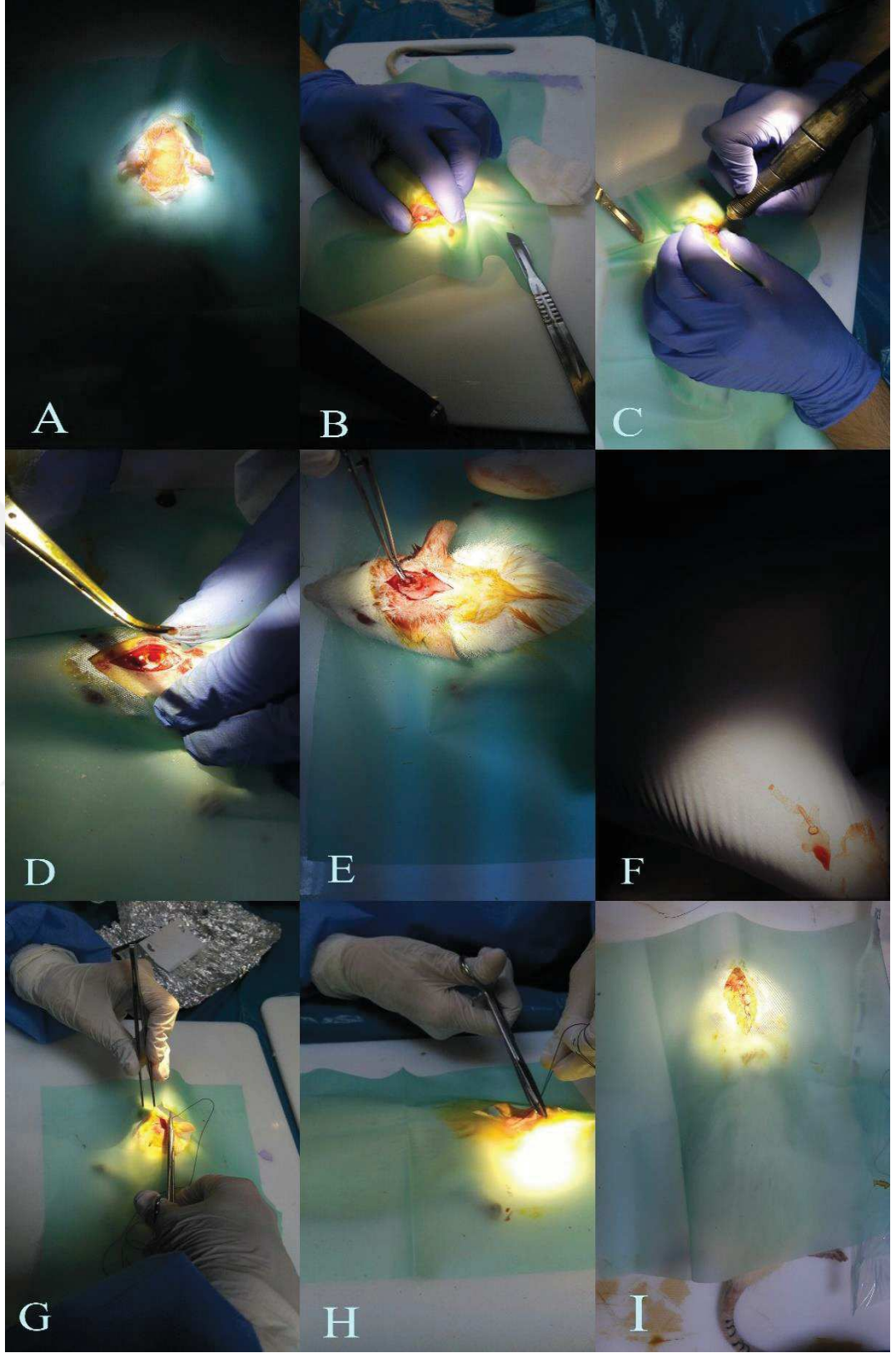
#### **3.4.1. Anestezi İşlemi**

Genel anestezi pinealektomi operasyonu ve deney sonrası kalpten ve vena jugularisten kan alımı için uygulandı. Bu amaçla ketamin (80 mg/kg) ve ksilazin (8 mg/kg) uygulandı.

### 3.4.2. Pinealektomi

Pinealektomi operasyonu grup 3, grup 4 ve grup 5'e uygulandı. Anestezi işleminden hemen sonra sıçanların kafa derisi traşlandı ve batikonla temizlendi. Kafatasının üst kısmına 20 numara bistüri ucuyla 3 cm'lik bir kesi atıldı ve cilt açıldı. Kafatası görünür hale geldikten sonra kafatası kemiğine ulaşmak için bistüri yardımıyla zarlarından arındırıldı ve lambda-bragma bölgeleri görünür hale geldi. Lambda bölgesinden 3-5 mm çapında drill (dişçi turu) yardımıyla açılan dairenin ortasındaki kalın kemik forsepsle kullanılarak kaldırıldı. 60° lik bir açıdan ince uçlu forseps yardımı ile pineal bezin bulunduğu bölgeye girilerek pineal bez sap kısmından tutulup çıkarıldı. Olası kanamaların önüne geçmek için steril gazlı bezler serum fizyolojikle ıslatılarak kullanıldı. Kanama olmadığından emin olunduktan sonra 3/0 ipek suturela dikilerek kapatıldı (Ovali ve Uzun, 2017). Grup 1 ve grup 2'ye ise pineal bezin çıkarılması işlemi hariç diğer tüm prosedürler aynen uygulandı. Egzersiz prosedürü melatonin yoksunluğu oluşması için operasyonlardan 7 gün sonra uygulandı.





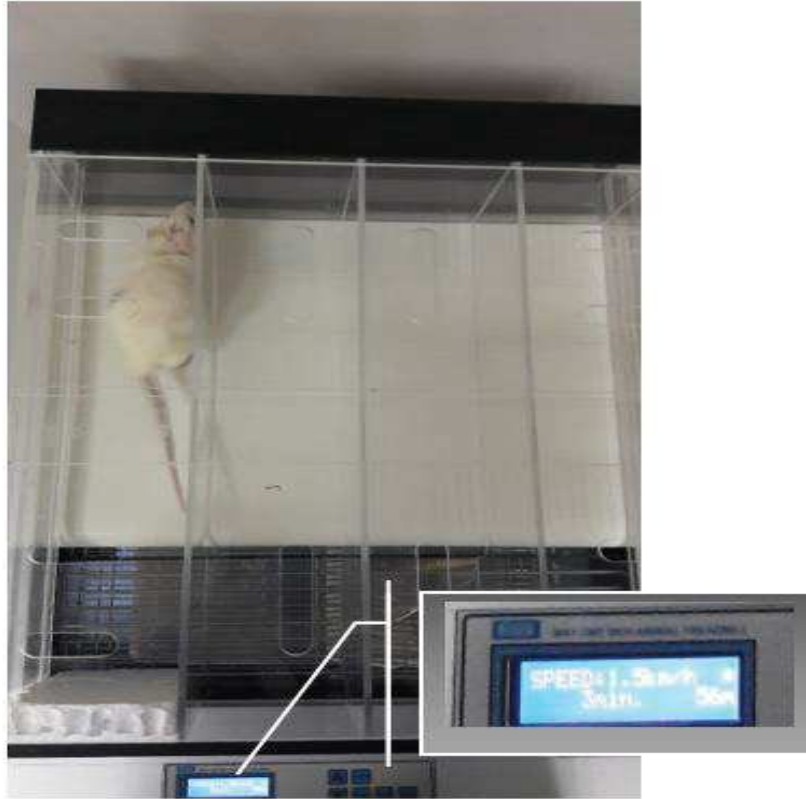
Resim 1. Pinealektomi operasyonunun yapılışı.

### 3.4.3. Egzersiz Protokolü

Çalışmanın 7. gününde sıçanlar egzersiz yapmak üzere hazırlandı. Bu amaçla gece sularına melatonin katılan gruplara egzerzisten 30 dakika önce vehicle intraperitoneal olarak, melatonin verilmeyen gruplara ise 30 dakika önce melatonin çözeltisi i.p. yolla verildi. Bu işlemler tüm gruplarda birliktelik sağlanması açısından sabah 09:00'da başlatıldı. Enjeksiyondan 30 dakika sonra (saat 09:00'da) sıçanlar treadmill koşu bandına alındı. Treadmill'in hızı 25 m/dk'ya ayarlandı ve sıçanlar elektrik uyarısına rağmen artık koşamayacak düzeye gelene kadar egzersize devam edildi (Veneroso ve ark., 2009).

Egzersizden önce sıçanlar 3 dakika süre ile egzersize alıştırıldı. Sıçanların artık egzersize devam edemeyeceğine karar verilmesi için aşağıdaki kriterler kullanıldı.

- Hayvanın koşu bandında yürümeyi sürdürememesi,
- Elektrik şoku veren ızgaradan kaçmayıp üzerinde oturması
- Manuel teşvike rağmen koşu bandına dönmemesi
- Normalde varolan "doğrulma refleksi"nin kaybolması (Kayatekin ve Şermin, 2003).



**Resim 2.** Egzersiz protokolünün uygulanması.

#### **3.4.4. Kanın Alınması**

Egzersiz işlemi tamamlandıktan sonra kan alma işlemine geçildi. Anestezi altında sıçanların juguler veninden kan sayımı için 2 ml venöz kan alındı ve EDTA'lı tüpe konuldu. EDTA'lı tüpe alınan kan hızlı bir şekilde lökosit sayımı ve periferik yayma işleminde kullanıldı.

Daha sonra hayvanların göğüs bölgesi açılarak kalpleri açığa çıkarıldı ve kardiyak kan alınarak soğutmalı santrifüjde +4°C'de 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen serumlar ELISA yapılmak üzere efendorflara alınıp -80 °C'de çalışma gününe kadar depolandı.

#### **Ötenazi Yapılması:**

Kan örnekleri alındıktan sonra hayvanlar servikal dislokasyon ile ötenazi edildi.

#### **3.4.5. Kalbin Alınması**

Ötenazi sonrası sıçanların kalpleri çıkarıldı. Sol ventrikül kalbin diğer bölümlerinden ayrılıp uygun tüplere alındı ve sıvı azot içerisine atıldı. Hızlıca dondurulan sol ventrikül örnekleri genetik çalışmalar yapılincaya kadar -80°C'de saklandı.

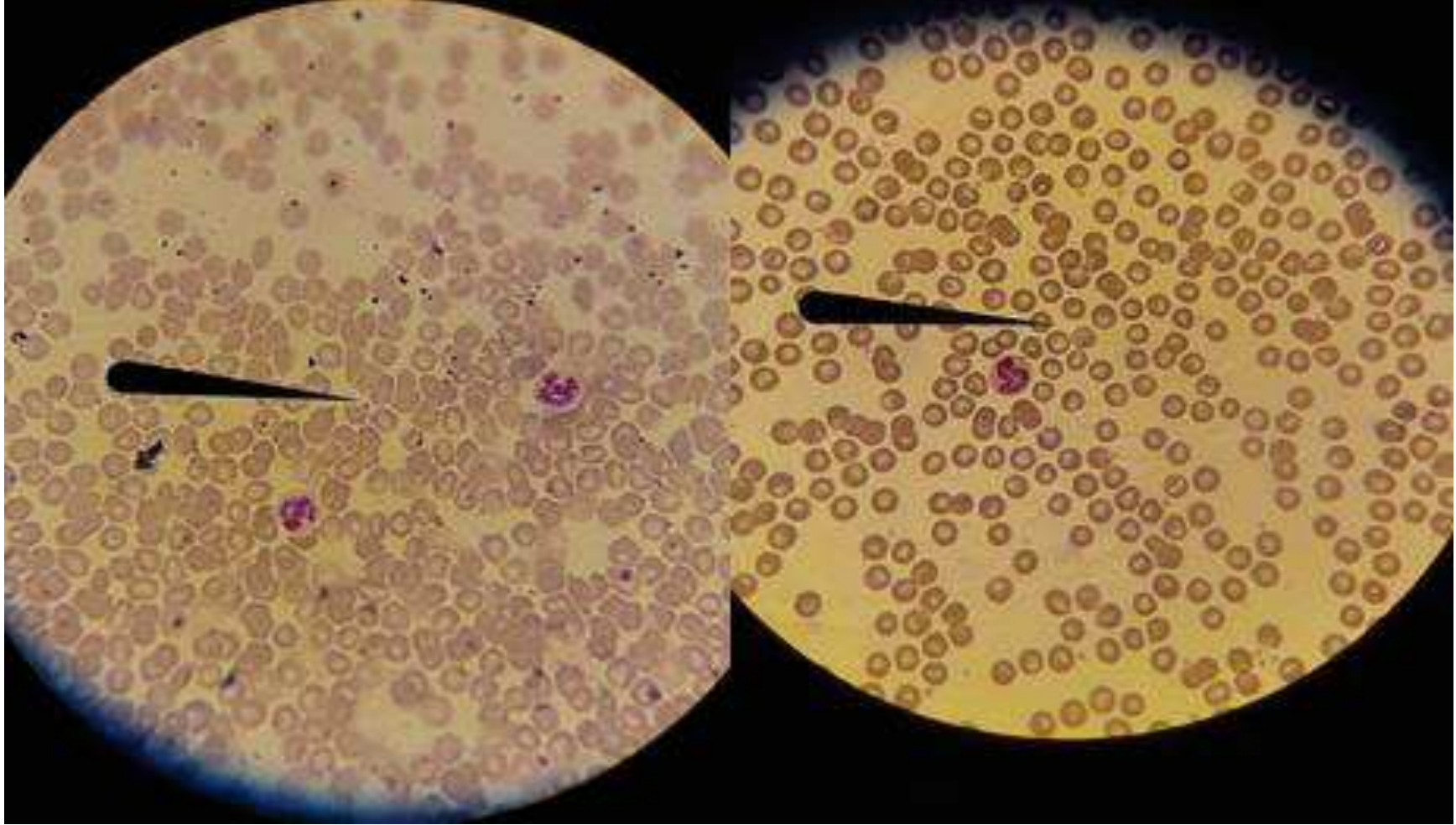
### **3.5. Hematolojik Analizler**

#### **3.5.1. Lökosit Sayımı**

Lökosit sayımı Truck solüsyonu kullanılarak Thoma lamında manuel yolla gerçekleştirildi.

#### **3.5.2. Lökosit Tiplerinin Belirlenmesi**

Lökosit tiplerini belirlemek amacı ile alınan taze kan örneklerine yaymaların May-Grünwald /Giemsa boyaması yapıldı. Periferik yaymada mikroskop altında lökosit tipleri belirlendi.



**Resim 3.** Boyanan lökositlerin 100X objektifte görüntüsü.

### 3.6. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler için alınan kan örnekleri 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlardan; TNF- $\alpha$ , IMA, NF- $\kappa\beta$ , cTnI, CORT ve CK-MB düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi (Wuhan fine biological technology co. Ltd, Fine Test, Çin).

#### 3.6.1. ELISA Analizleri

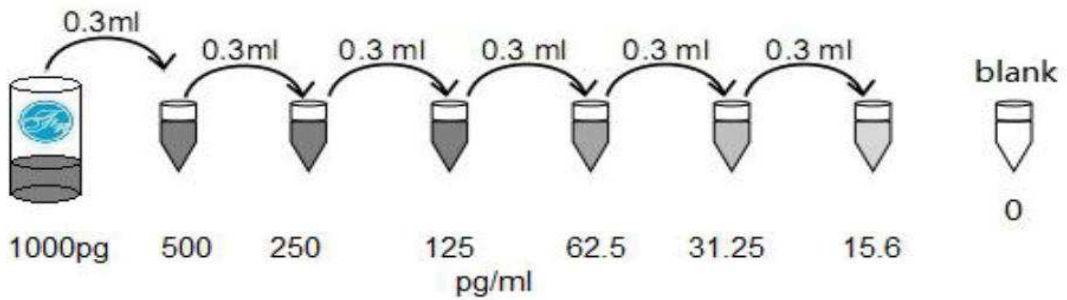
Kortikosteron için elisa çalışması, inönü üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim dalı’nda yürütülmüştür. Diğer analizleri ELISA aşağıdaki TNF- $\alpha$  ELISA prosedürü takip edilerek çalışıldı. Çalışılan parametrelerin farklı kalibrasyon konsantrasyonları belirtildi.

##### 3.6.1.1. TNF- $\alpha$ ELISA Prosedürü

Kandan serum örneklerinden TNF- $\alpha$  düzeyleri ticari ELISA kiti (kiti yaz ve lot) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kitte belirtilen yöntemler uygulanmıştır.

Çalışmaya başlamadan önce yapılan hazırlıklar:

1. Yıkama tamponu: konsantr 30 ml yıkama tamponunu 750 ml deiyonize ya da distile suyla dilüe edildi ve hazırlanan bu dilüsyon elisa plate yıkama cihazına (Elisa Plate Yıkayıcı Biotek ELx50) yerleştirildi.
2. 5000 pg/ml standart solusyonunun hazırlanması: Standart tüpün içine 1 ml sample/standart dilüsyonu eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
3. 2500 pg/ml  $\rightarrow$  78 pg/ml standart solusyonunun hazırlanması: Altı efendorf 1’den 6’ya kadar numaralandırıldı. Herbir tüpe 0,3 ml simple/standart dilüsyon tamponu eklendi. 1.tüpten 2.tüpe 0,3 ml aktarıldı. 2.tüpten 3.tüpe 0,3 ml aktarıldı ve bu aktarma işi 6. Tüpe kadar aynı miktarda devam ettirildi.



**Resim 4.** TNF- $\alpha$  kalibrasyon konsantrasyonları (Kitin standart prosedürüdür).

Biotin-Detection Antibody Working solüsyonu:

Çalışmadan 1 saat önce hazırlandı. Çalışmada kullanılacak miktar hesaplandı (0,1ml kuyu X kuyu sayısı). 1:100 Antibody solüsyonuyla Biotin-Detection Antibody dilüe edildi (1 µl Biotin-Detection Antibody, 99 µl Antibody dilüsyon tamponu).

HRP-Streptavidin Conjugate (SABC) Working solüsyonu:

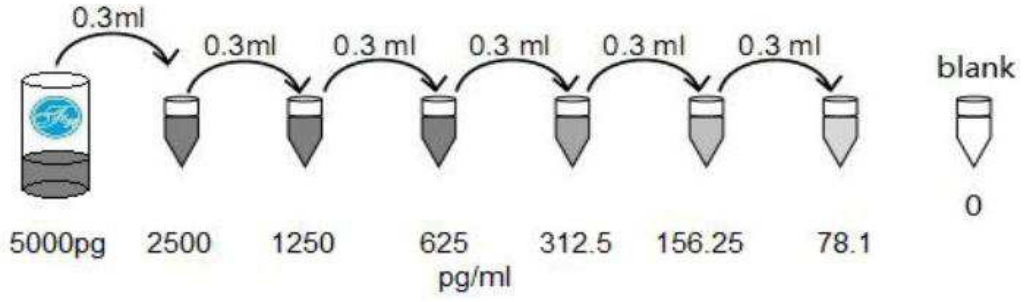
Çalışmadan 30 dakika önce hazırlandı. Çalışmada kullanılacak miktar hesaplandı (0,1ml kuyu X kuyu sayısı). 1:100 SABC dilüsyon tamponuyla SABC dilüe edildi (1 µl SABC, 99 µl SABC dilüsyon tamponu).

Elisa çalışma prosedürü:

1. Standartları ve örnekleri plate'deki kuyulara yüklenmeden önce plate yıkama cihazında 2 kez yıkandı.
2. Standartlar kuyulara yüklendi. Serumlar vortexlendi ve 0,1 ml'lik (100 µl) volümlerle kuyulara yüklendi. Kit içerisindeki şeffaf bantlarla plate kapatıldı ve 37°C'de 90 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. 100 µl (0,1 ml) Biotin detection antibody working solüsyon her bir kuyuya eklendi. Plate kaplandı ve 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra şeffaf kaplama bantı çıkarıldı ve plate yıkama cihazına yerleştirilerek 3 kez yıkandı.
5. 100 µl (0,1 ml) SABC working solüsyonu her bir kuyuya eklendi. Plate kaplandı ve 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra şeffaf kaplama bantı çıkarıldı ve plate yıkama cihazına yerleştirilerek 5 kez yıkandı.
7. 90 µl TMB substrat eklendi. Karanlıkta 37°C'de 15-20 dakika inkübe edildi ve renk değişimi gözlemlendi (normalde sarı olan kuyuların mavi renge dönüşmesi beklenir).

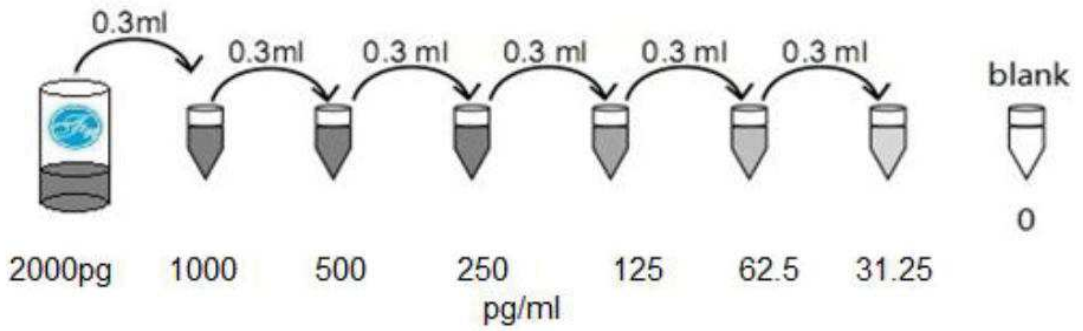
50 µl durdurma (stop) solüsyonu eklendi. Renk tamamen sarı olduğunda plate spektrofotometri cihazına (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific™, Finlandiya) kondu ve 450 nm'de okuma yapıldı.

### 3.6.1.2. NF- $\kappa$ B ELISA Kalibrasyon Konsantrasyonları



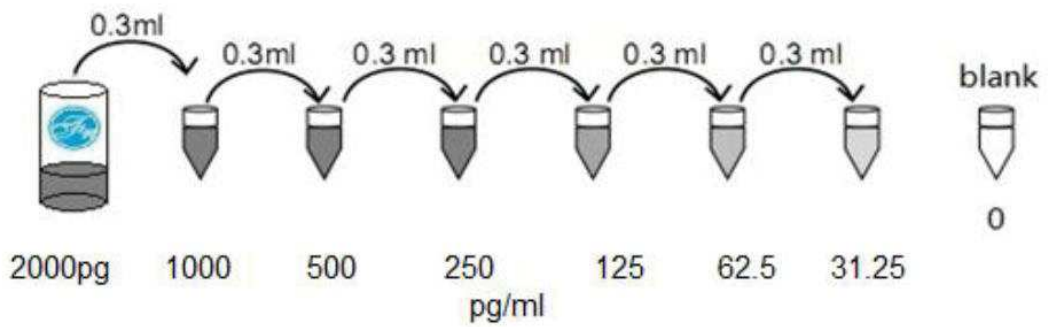
**Resim 5.** NF- $\kappa$ B kalibrasyon konsantrasyonları (Kitin standart prosedürüdür).

### 3.6.1.3. cTnI ELISA Kalibrasyon Konsantrasyonları



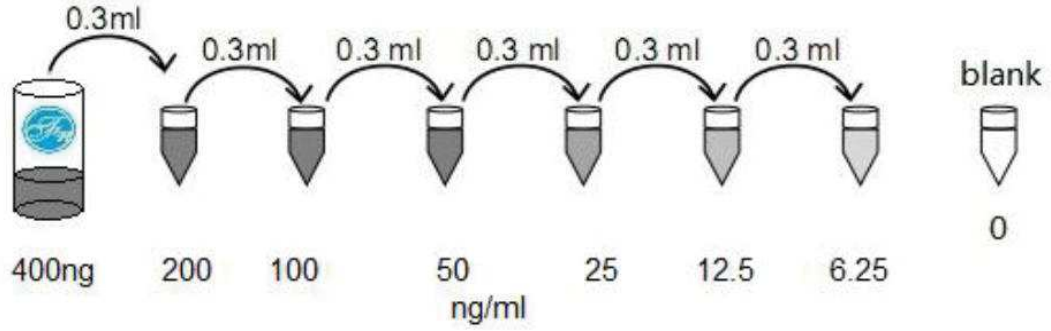
**Resim 6.** cTnI kalibrasyon konsantrasyonları (Kitin standart prosedürüdür).

### 3.6.1.4. CK-MB ELISA Kalibrasyon Konsantrasyonları



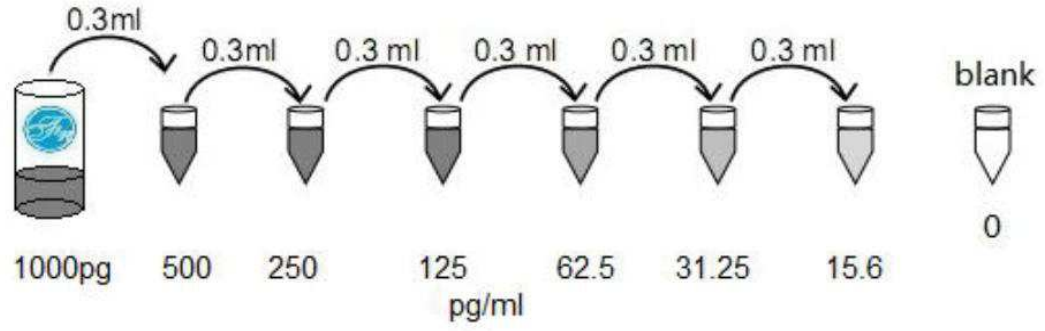
**Resim 7.** CK-MB kalibrasyon konsantrasyonları (Kitin standart prosedürüdür).

### 3.6.1.5. IMA ELISA Kalibrasyon Konsantrasyonları



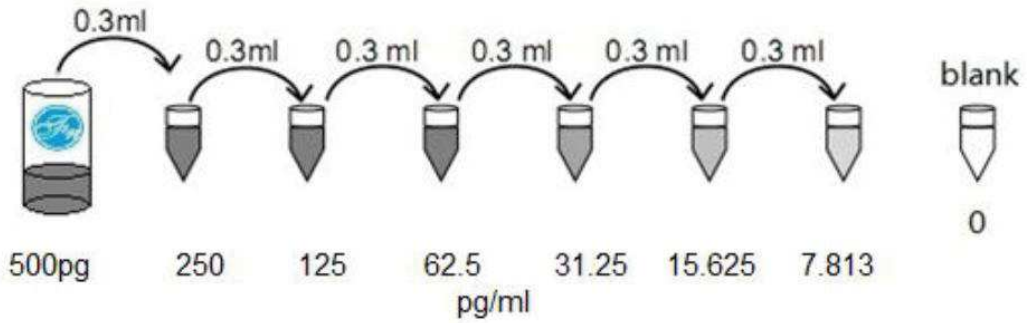
**Resim 8.** IMA kalibrasyon konsantrasyonları (Kitin standart prosedürüdür).

### 3.6.1.6. PCT ELISA Kalibrasyon Konsantrasyonları



**Resim 9.** PCT kalibrasyon konsantrasyonları (Kitin standart prosedürüdür).

### 3.6.1.7. 6-Hidroksimelatonin Sülfat (6-HMS) ELISA Kalibrasyon Konsantrasyonları



**Resim 10.** 6-Hidroksimelatonin sülfat kalibrasyon konsantrasyonları (Kitin standart prosedürüdür).



### 3.6.1.8. Kortikosteron ELISA Prosedürü

Örnekler, sıçan serumunda kortikosteron ölçümü üzere geliştirilen ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kitiyle analiz edildi (Cakan ve ark., 2016). Kısaca, 96-kuyucuklu immun plakalar (Kod: 439454, Thermo Scientific Nunc A/S, Kamstrupvej, Danimarka) kortikosteron: BSA stok solüsyonuyla kaplandı (1 µg ml<sup>-1</sup>, 200 µl/kuyucuk, seyreltme için karbonat tamponu, pH 9.6). Plakalar +4 °C’de geceboyu inkübe edildi ve yıkama solüsyonu ile yıkandı. Bağlanma olmayan bölgeler, bloklama solüsyonuyla (200 µl/kuyucuk) bloklandı ve 2 saat 37°C’de inkübe edildi. Farklı bir plakada (Kod: 249950, Thermo Fisher Scientific, Rochester, ABD), örnekler ve standartlar 45 dak 37 °C’de primer antikör ile preinkübe edildi. Preinkübe edilen örnekler ve standartlar, duplike olarak kaplı plaklara aktarıldı ve 45 dak 37 °C’de inkübe edildi. Yıkama aşamasından sonra kuyucular biyotin ile işaretlenmiş anti-rabbit antikörleriyle (100 ul/kuyucuk) inkübe edildi (30 dak 37 °C).

Kuyucuklar tekrar yıkandı ve streptavidin peroksidaz solüsyonuyla (100 µl/kuyucuk) 15 dak 37 °C’de inkübe edildi. Plakalar tekrar yıkandı ve substrat (tetrametilbenzidin) eklendi (150 µl/kuyucuk). İnkübasyondan sonra (karanlıkta 10 dak), durdurma solüsyonu eklendi (sülfirik asit %10’luk, 50 µl/kuyucuk) ve aborbans plaka-okuyucu spektrofotometrede (Biotek, Synergy HT, PA, ABD) 450 nm’de okundu. Yazılım yoluyla veriler değerlendirildi (Biotek, Gen5, PA, ABD). Test içi varyasyon katsayısı < %7 düzeyindedir. Test 10-2000 ng/ml dinamik aralığa sahiptir.

### 3.7. Genetik Analizler

Genetik analizler alınan sol ventrikül doku örneklerinde gerçekleştirildi. - 80°C’den çıkarıldı ve buz aküsünün üzerine konuldu.

#### 3.7.1. Total RNA İzolasyonu

Her dokudan 25-30 mg olacak şekilde 2 ml’lik steril ependorf tüplere konuldu. Ependorf tüpler 10 sn sıvı azotta bekletildi. Homojenizatörde (Retsch MM400) dokular homojenize edildi. RNA izolasyonu için PURE Link RNA Mini Kit (Cat No.121B301BA) kullanıldı. İşlemler kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı. Elde edilen RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonunu belirlemek için NanoDrop ND-1000 kullanılarak ölçüm yapıldı. Saflık oranını ise 260/280 nm’de ölçüm yaptığımız RNA’lardan 1.8-2.1 arası değerler kabul edildi.

### 3.7.2. cDNA Eldesi

PCR işlemi için RNA, su ve reaksiyon için gerekli tampon miktarı hesaplandıktan sonra cDNA kiti (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems™) ve RNA eldeleri steril kabin içerisine buz aküsünün üzerinde konumlandırıldı.

Tampon bileşenleri ve miktarları aşağıdaki gibidir.

**Tablo 1.** cDNA Sentez Protokolü

<b>cDNA sentezi</b>	<b>1 örnek için hacim</b>
10 x RT Buffer	2 µl
dNTP	0.8 µl
Random Primer MultiScribe®	2 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
dH <sub>2</sub> O	4.2 µl
RNA	10 µl
<b>TOPLAM</b>	<b>20 µl</b>

Hazırlanan tüpler PCR cihazına (The Applied Biosystems®, 2720 Thermal Cycler) yerleştirildi ve aşağıdaki prosedür izlendi.

**Tablo 2.** PCR Koşulları

<b>PCR Koşulları</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>
1.Adım	25°C	10 dk
2.Adım	37°C	120 dk
3.Adım	85°C	5 dk
4.Adım	4°C	∞

Toplamda 2 saat 15 dakikalık prosedürden sonra elde edilen cDNA'lar RT-PCR çalışma gününe kadar -20°C'de depolandı.

TLR 4 (GenBank NC\_005104.4 ve Rn00599848\_m1), CASPASE 3(Gen-Bank NC\_005115.4 ve Rn00563902) ve genlerinin normalizasyonu için hamarat (housekeeping gene) gen olan  $\beta$ -Actin (Gen-Bank NC\_005111.4 ve Rn00667869) için TaqMan® gen ekspresyon kiti kullanıldı. Gen ekspresyon seviyelerindeki olası değişiklikler önceden tanımlanmış metod olan RQ kullanılarak tespit edildi (Crespo ve ark., 2008).

### 3.7.3. RT-PCR çalışması

Quantitive Real-Time PCR (StepOnePlus™ Real-Time PCR System) çalışması için elde edilen cDNA örnekleri kullanıldı. Gen ekspresyon seviyelerinin analizi için TaqMan (RealQ Plus 2x Master Mix, Ampliqon, Danimarka) kullanıldı. Belirlenen genlerin ekspresyonu için aşağıdaki prosedür uygulandı.

**Tablo 3.** Real Time PCR ingrediyeent miktarları

<b>İngrediyent</b>	<b>Bir örnek için hacim</b>
RealQ Plus 2x Master Mix	10 $\mu$ l
Probe	1 $\mu$ l
PCR Grade Su	8 $\mu$ l
cDNA	1 $\mu$ l
<b>Toplam</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

TLR 4 ve Caspaz-3 gen ifadeleri için bu genlerin normalizasyonu hamarat gen (housekeeping gene) olan  $\beta$ -Actin kullanılmıştır. Bu çalışmada PCR yöntemindeki sonuçları doğrulamak için Real-Time PCR (qRT-PCR) cihazı kullanılarak qRT-PCR çalışması yapılmıştır.

### 3.8. İstatistiksel Analiz

Genetik analizler qRT-PCR yönteminden elde edilen CP (crossing points) değerleri düzenlendi. Genetik istatistik için ise qRT-PCR sonuçları  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  formülü kullanılarak hesaplandı.

Elde edilen veriler ortalama  $\pm$  standart hata (SH) olarak belirtildi. Verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyleri “SPSS for Windows version 16” (Chicago, IL, USA) programı kullanılarak belirlendi. Çoklu grup karşılaştırması Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. İki grup arasındaki karşılaştırmada ise Mann Whitney U-testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi en az  $p < 0.05$  olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## **4. BULGULAR**

Bu çalışmada; grup 1 (SHAM), grup 2 (SHAM+MLT30), grup 3 (PLT), grup 4 (PLT+MLT30) ve grup 5 (PLT+MLT) olmak üzere 5 farklı grup oluşturuldu. Çalışma süresince toplam 35 adet sıçan kullanıldı. Çalışmanın 7. gününde tüm gruplara egzersiz protokolü uygulandı ve egzersiz sonrası alınan kan ve doku örneklerinden hedeflenen hematolojik, biyokimyasal ve genetik analizler yapıldı.

### **4.1. Sıçanların Canlı Ağırlıkları**

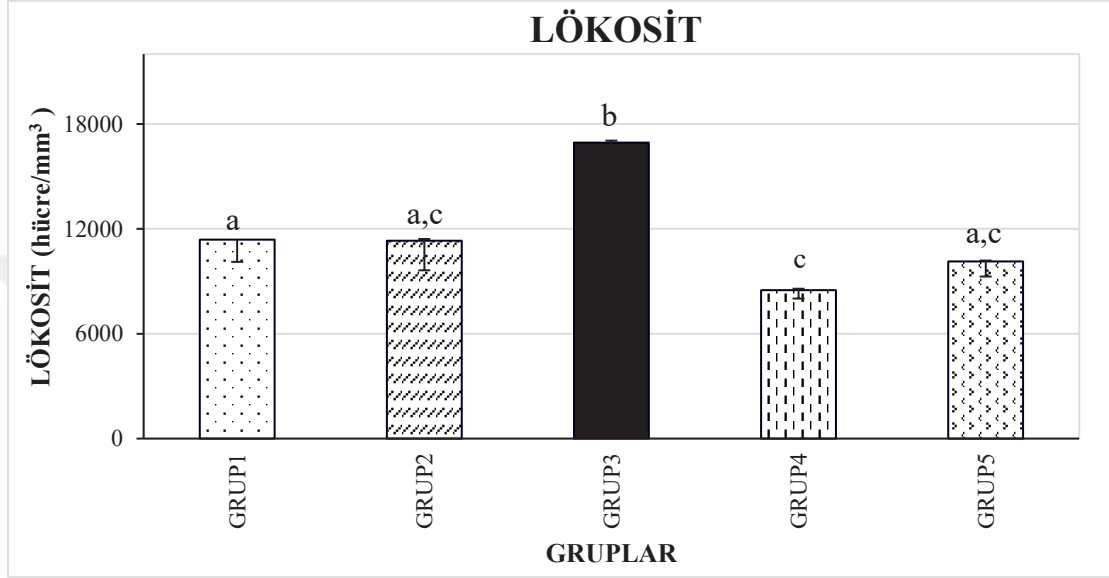
Çalışmaya başlamadan önce sıçanlar tartılarak tüm grupların birbirine yakın canlı ağırlık değerlerine sahip olması sağlandı. Bu amaçla ortalama canlı ağırlıkları 250-300 g aralığında olan sıçanlar çalışmaya dahil edildi. Çalışmanın 7. gününde canlı ağırlık değerleri tekrar ölçüldü.

### **4.2. Hematolojik veriler**

Bu amaçla alınan kan örneklerinden lökosit sayımı yapıldı. Total kan örneklerinden ayrıca periferik yayma yapılarak lökosit sayımı ve lökosit yüzdesi belirlendi.

#### 4.2.1. Kan Lökosit Düzeyindeki Değişiklikler

Kan lökosit sayıları açısından en yüksek değer  $16.936 \pm 920 /\text{mm}^3$  olarak grup 3' de ve en düşük değer ise  $8493 \pm 48 /\text{mm}^3$  olarak grup 4'te belirlendi. Grupların kan lökosit düzeylerindeki değişimler ve istatistiksel farklıları şekil 13'de gösterildi. ( $p \leq 0,05$ ).



Şekil 13. Tüm gruplara ait kan lökosit sayısı değerlerindeki değişimler (Farklı harflerle ifade edilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak farklı,  $p < 0,05$ ).

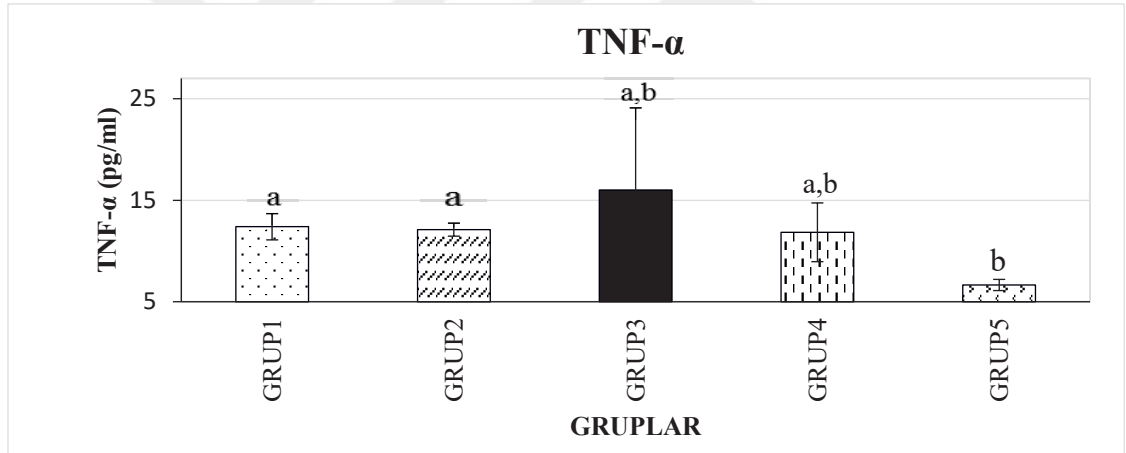
GRUPLAR	SHAM PLT	PLT	AKUT EGZERSİZ	YOĞUN	30' VEHICLE	ÖNCE ENJ	30' ÖNCE MELATONİN ENJ	7 GÜN VEHICLE İÇEREN SU	7 GÜN MELATONİNLİ SU	GÜN
GRUP 1	+	-	+	+	+	-	+	-		
GRUP 2	+	-	+	+	-	+	+	-		
GRUP 3	-	+	+	+	+	-	+	-		
GRUP 4	-	+	+	+	-	+	+	-		
GRUP 5	-	+	+	+	+	-	-	+		

### 4.3. Biyokimyasal veriler

Çalışmada biyokimyasal analizler için sıçanlardan kan örnekleri alınarak serum elde edildi. Elde edilen serum örneklerinden egzersiz, PLT ve melatoninin stres üzerine olan etkilerini incelemek için CORT düzeyleri, yangısal durumun ortaya çıkması üzerine olan etkilerini belirlemek için TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa\beta$  ve PCT düzeyleri, kalp kası hasarı üzerine olan etkilerini belirlemek için CK-MB ve cTnI düzeyleri ile kalp iskemisi üzerine olan etkilerini araştırmak için ise IMA seviyeleri belirlendi.

#### 4.3.1. Kan TNF- $\alpha$ Düzeyindeki Değişiklikler

Deneklerden elde edilen serum örneklerinde belirlenen TNF- $\alpha$  seviyeleri açısından grup 5'te belirlenen değer grup 1 ve 2'ye göre anlamlı düzeyde düşük olduğu anlaşıldı. TNF- $\alpha$  seviyeleri açısından en yüksek değer grup 3'te belirlendi. Tüm gruplara ait TNF- $\alpha$  verileri şekil 14'de gösterildi.

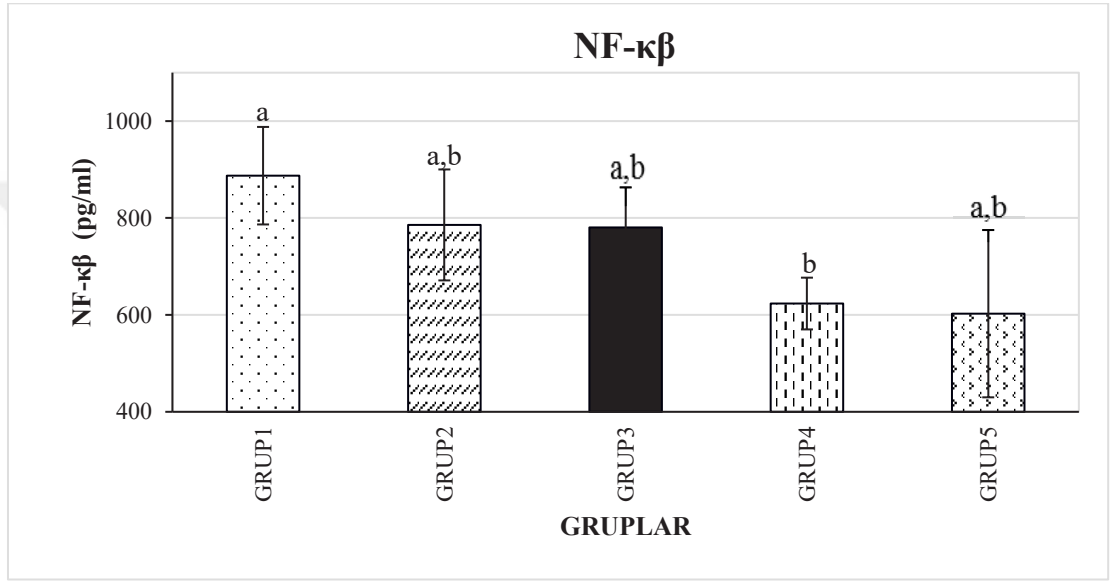


**Şekil 14.** Tüm gruplara TNF- $\alpha$  ait değerleri (Farklı harflerle ifade edilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak farklı,  $p < 0,05$ ).

GRUPLAR	SHAM PLT	PLT	AKUT EGZERSİZ	YOĞUN	30' VEHICLE	ÖNCE ENJ	30' MELATONİN ENJ	ÖNCE	7 VEHICLE İÇEREN SU	GÜN	7 MELATONİNLİ SU	GÜN
GRUP 1	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
GRUP 2	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
GRUP 3	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
GRUP 4	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
GRUP 5	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+

### 4.3.2. Kan NF-κβ Düzeyindeki Değişiklikler

NF-κβ düzeyleri açısından en düşük değerin grup 5'te olduğu ( $603 \pm 173$  pg/ml) belirlendi. Grup 4'e ait NF-κβ düzeylerinin de diğer gruplara göre düşük olduğu ve bu azalmanın grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlılık gösterdiği belirlendi ( $p < 0.05$ ). Tüm gruplara ait NF-κβ verileri şekil 15'de gösterildi.



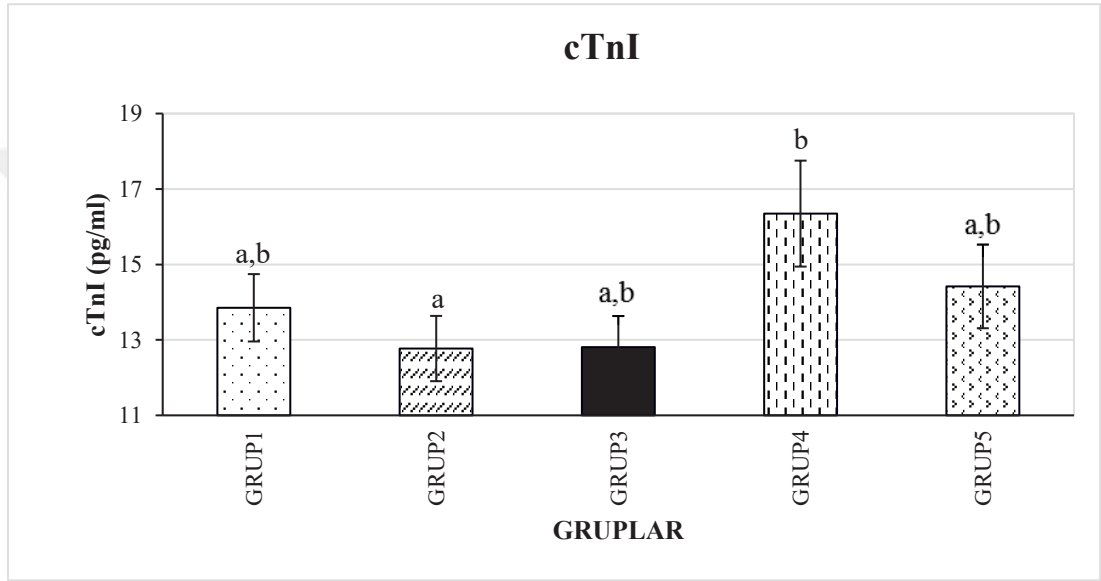
Şekil 15. Tüm gruplara ait NF-κβ değerleri (Farklı harflerle ifade edilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak farklı,  $p < 0,05$ ).

GRUPLAR	SHAM PLT	PLT	AKUT EGZERSİZ	YOĞUN	30' VEHICLE	ÖNCE ENJ	30' ÖNCE MELATONİN ENJ	7 VEHICLE İÇEREN SU	GÜN 7 MELATONİNLİ SU	GÜN
GRUP 1	+	-	+	+	+	-	+	-		
GRUP 2	+	-	+	+	-	+	+	-		
GRUP 3	-	+	+	+	+	-	+	-		
GRUP 4	-	+	+	+	-	+	+	-		
GRUP 5	-	+	+	+	+	-	-	+		



### 4.3.3. Kan cTnI Düzeyindeki Değişiklikler

Deney sonrası sıçanlardan elde edilen kan örneklerinde cTnI düzeylerinde 2. ve 4. grup arasında anlamlı istatistiksel anlamlılık olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek değer pinealektomi uygulaması yapıp egzersizden 30 dakika önce melatonin enjeksiyonu yapılan 4. grupta  $16.3 \pm 1.4$  pg/ml olduğu ve en düşük değer ise tamamen melatonin yoksunluğu oluşturulmuş 3. grupta  $14.4 \pm 1.1$  pg/ml olduğu saptanmıştır. Tüm gruplara cTnI ait verileri şekil 16'da gösterildi.

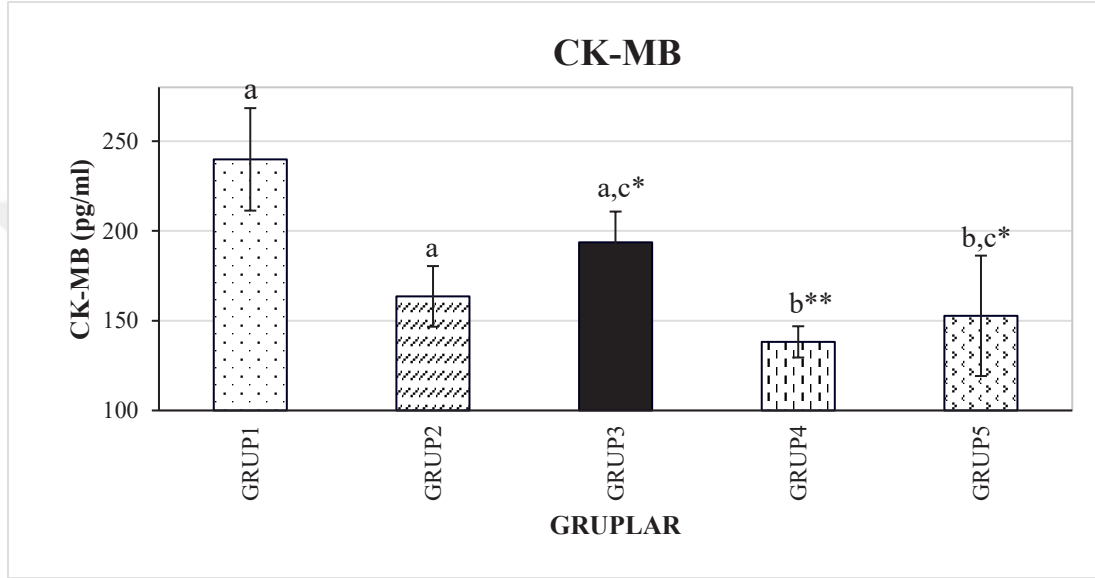


Şekil 16. Tüm gruplara ait cTnI düzeyleri. (Farklı harflerle ifade edilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak farklı,  $p < 0,05$ ).

GRUPLAR	SHAM PLT	PLT	AKUT EGZERSİZ	YOĞUN	30' VEHICLE	ÖNCE ENJ	30' ÖNCE MELATONİN ENJ	7 GÜN VEHICLE İÇEREN SU	7 GÜN MELATONİNLİ SU	7 GÜN
GRUP 1	+	-	+	+	+	-	+	-	-	
GRUP 2	+	-	+	+	-	+	+	+	-	
GRUP 3	-	+	+	+	+	-	+	+	-	
GRUP 4	-	+	+	+	-	+	+	+	-	
GRUP 5	-	+	+	+	+	-	-	-	+	

#### 4.3.4. Kan CK-MB Düzeyindeki Değişiklikler

Deneklerden alınan kan örneklerinde CK-MB düzeylerinde 1. ve 4. grup arasında, 1. ve 5. grup arasında, 3. ve 4. grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmiştir. Gruplar arasında en düşük değer 4. Grupta  $138 \pm 9$  pg/ml iken en yüksek değer 1. Grupta  $240 \pm 29$  pg/ml olduğu saptanmıştır. Tüm gruplara ait CK-MB verileri şekil 17’de gösterildi.

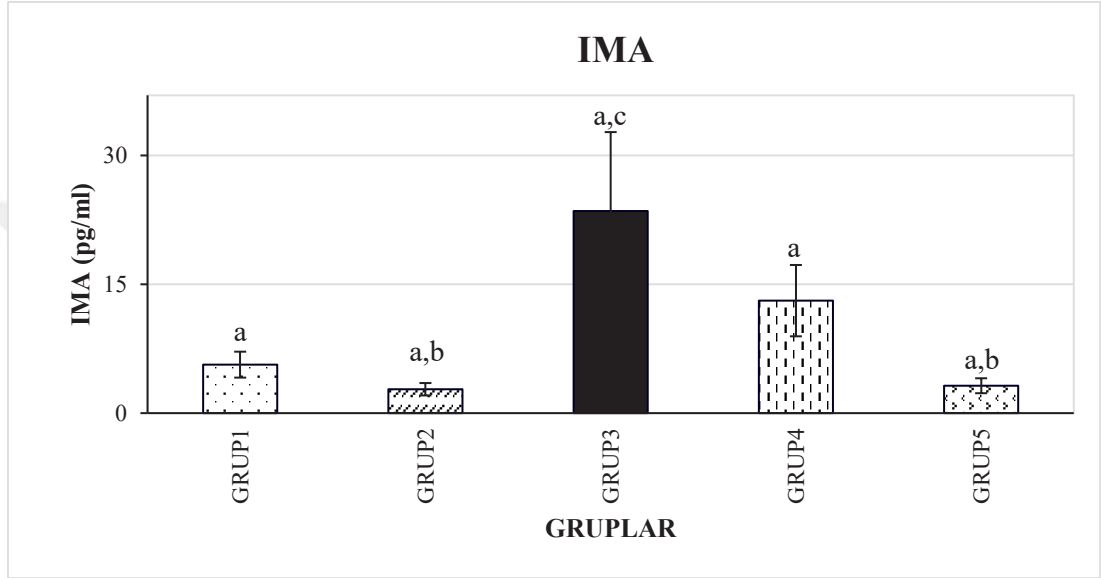


**Şekil 17.** Tüm gruplara ait CK-MB değerleri (Farklı harflerle ifade edilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak farklı, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ ).

GRUPLAR	SHAM PLT	PLT	AKUT EGZERSİZ	YOĞUN	30' VEHICLE	ÖNCE ENJ	30' ÖNCE MELATONİN ENJ	7 VEHICLE İÇEREN SU	GÜN	7 MELATONİNLİ SU	GÜN
GRUP 1	+	-	+	+	+	-	+	-			
GRUP 2	+	-	+	+	-	+	+	-			
GRUP 3	-	+	+	+	+	-	+	-			
GRUP 4	-	+	+	+	-	+	+	-			
GRUP 5	-	+	+	+	+	-	-	+			

#### 4.3.5. Kan IMA Düzeyindeki Değişiklikler

Sıçanlardan alınan kan örneklerinde IMA seviyeleri arasında 2. ve 3. grup, 2. ve 4. grup, 3. ve 5. grup, 4. ve 5. grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmiştir. Bununla birlikte en yüksek değer 3. grupta  $23.5 \pm 9.1$  pg/ml olduğu ve en düşük değer ise 2. grupta  $2.7 \pm 0.7$  pg/ml olduğu görülmüştür. Tüm gruplara ait IMA verileri şekil 18’de gösterildi.

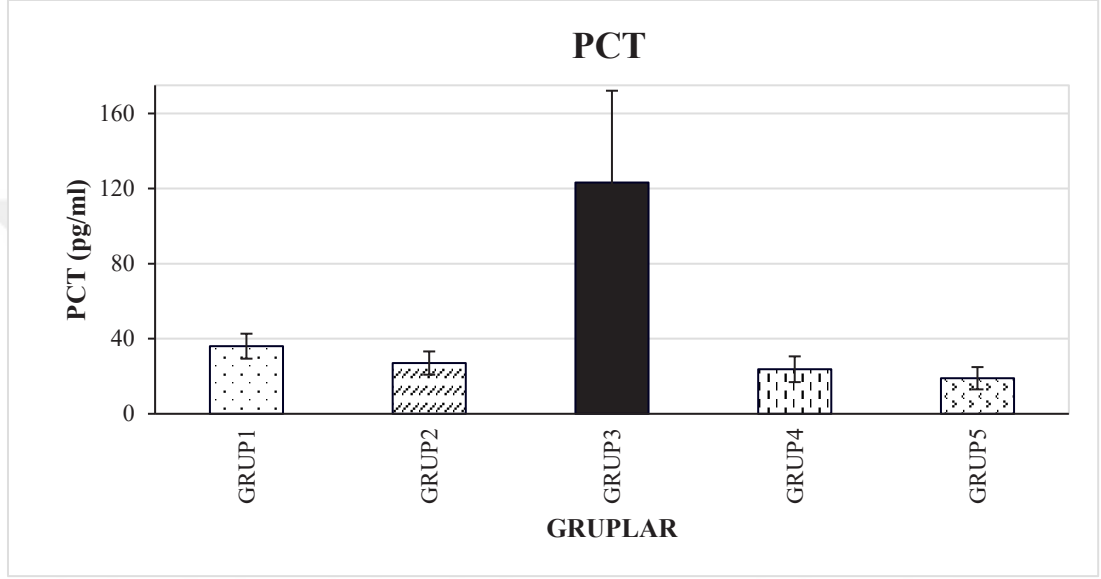


**Şekil 18.** Tüm gruplara ait IMA düzeyleri. (Farklı harflerle ifade edilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak farklı,  $p < 0,05$ ).

GRUPLAR	SHAM PLT	PLT	AKUT EGZERSİZ	YOĞUN	30' VEHICLE ENJ	ÖNCE ENJ	30' ÖNCE MELATONİN ENJ	7 GÜN VEHICLE İÇEREN SU	7 GÜN MELATONİNLİ SU	7 GÜN
GRUP 1	+	-	+	+	+	-	+	-		
GRUP 2	+	-	+	+	-	+	+	-		
GRUP 3	-	+	+	+	+	-	+	-		
GRUP 4	-	+	+	+	-	+	+	-		
GRUP 5	-	+	+	+	+	-	-	+		

#### 4.3.6. Kan PCT Düzeyindeki Değişiklikler

PCT düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamasına rağmen grup 3'te belirlenen PCT düzeyinin ( $123 \pm 49$  pg/ml) diğer tüm gruplara göre 3-4 kat daha yüksek olduğu anlaşıldı. Diğer gruplardaki veriler ise birbirlerine yakın olarak belirlendi. Tüm gruplara ait PCT verileri şekil 19'da gösterildi.

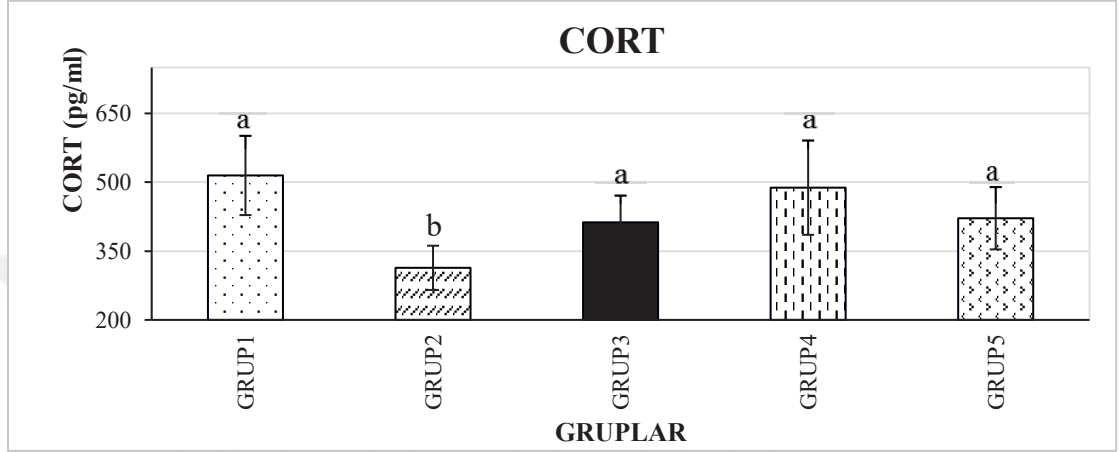


Şekil 19. Tüm gruplara ait PCT değerleri.

GRUPLAR	SHAM PLT	PLT	AKUT EGZERSİZ	YOĞUN	30' VEHICLE	ÖNCE ENJ	30' MELATONİN ENJ	ÖNCE	7 VEHICLE	GÜN	7 MELATONİNLİ	GÜN
GRUP 1	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
GRUP 2	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
GRUP 3	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
GRUP 4	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
GRUP 5	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+

#### 4.3.7. Kan CORT Düzeylerindeki Değişimler

CORT düzeyleri açısından bakıldığında en düşük değer grup 2’de en yüksek değer ise grup 1’de belirlendi. Grup 2’den belirlenen  $313,5 \pm 48,1$  değer diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu anlaşıldı ( $p < 0,05$ ). CORT düzeyleri açısından gruplara ait değerler ve istatistiksel önemi şekil 20’de verildi.



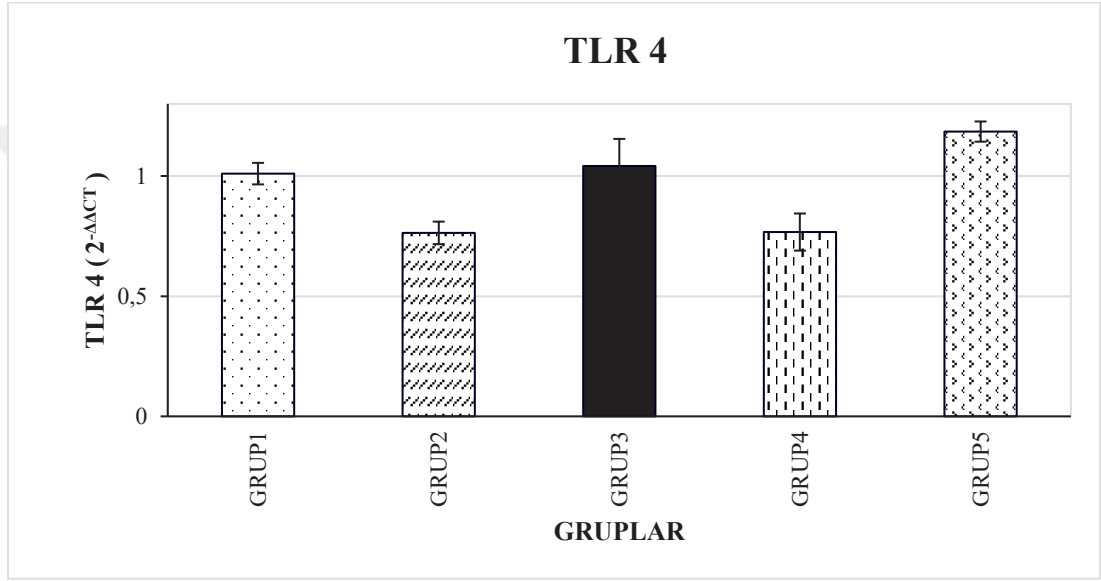
**Şekil 20.** Tüm gruplara ait CORT düzeylerindeki değişimler (Farklı harflerle ifade edilen değerler birbirlerinden istatistiksel olarak farklı,  $p < 0,05$ ).

GRUPLAR	SHAM PLT	PLT	AKUT EGZERSİZ	YOĞUN	30' VEHICLE ENJ	ÖNCE ENJ	30' ÖNCE MELATONİN ENJ	7 GÜN VEHICLE İÇEREN SU	7 GÜN MELATONİNLİ SU	GÜN
GRUP 1	+	-	+	+	+	-	+	-		
GRUP 2	+	-	+	+	-	+	+	-		
GRUP 3	-	+	+	+	+	-	+	-		
GRUP 4	-	+	+	+	-	+	+	-		
GRUP 5	-	+	+	+	+	-	-	+		

#### 4.4. Genetik Veriler

##### 4.4.1. Sol Ventrikülde TLR-4 Düzeyindeki Değişiklikler

Deneklerden alınan kalp dokusu örneklerinde TLR-4 gen ekspresyon düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmemiştir. Bununla birlikte en yüksek TLR-4 düzeyi 4. grupta  $1.18 \pm 0.04$ , en düşük ise 2. grupta  $0.76 \pm 0.04$  olduğu belirlenmiştir. Tüm gruplara ait TLR-4 verileri şekil 21’de gösterildi.

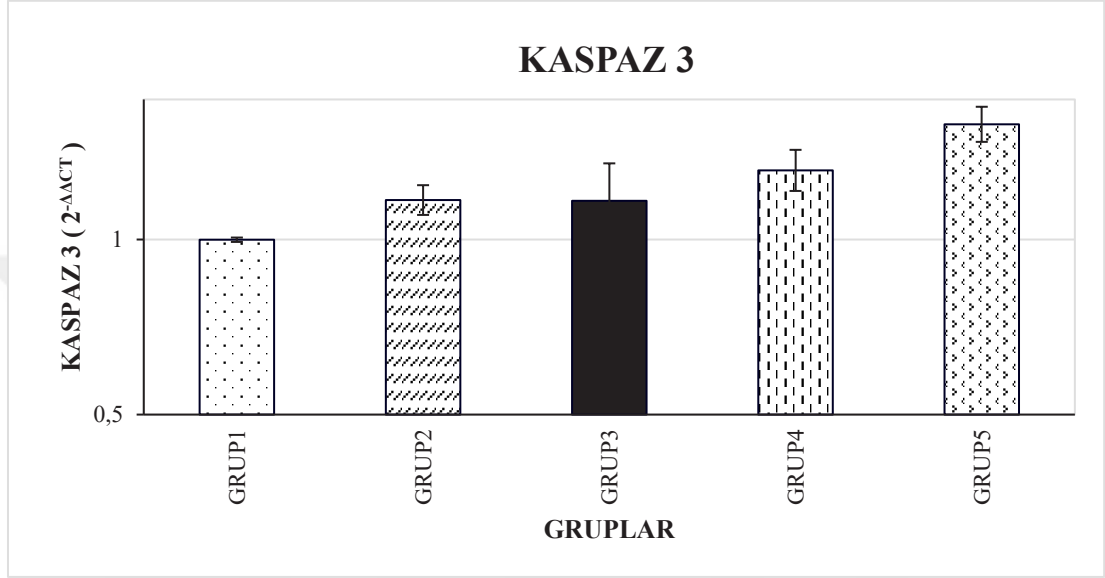


Şekil 21. Tüm gruplara ait TLR-4 düzeyleri.

GRUPLAR	SHAM PLT	PLT	AKUT EGZERSİZ	YOĞUN	30' VEHICLE	ÖNCE ENJ	30' MELATONİN ENJ	ÖNCE	7 VEHICLE İÇEREN SU	GÜN	7 MELATONİNLİ SU	GÜN
GRUP 1	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
GRUP 2	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
GRUP 3	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
GRUP 4	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
GRUP 5	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+

#### 4.4.2. Sol Ventrikülde Kaspaz-3 Düzeyindeki Değişiklikler

Sıçanlardan alınan kalp dokusu örneklerinde kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanamamıştır. En yüksek kaspaz-3 seviyesi 5. grupta  $1.32 \pm 0.05$  ve en düşük seviyesi ise SHAM grubunda yani 1. grupta  $0.99 \pm 0.00$  olduğu belirlenmiştir. Tüm gruplara ait kaspaz-3 verileri şekil 22’de gösterildi.



Şekil 22. Tüm gruplara ait kaspaz-3 düzeyleri.

GRUPLAR	SHAM PLT	PLT	AKUT EGZERSİZ	YOĞUN	30' VEHICLE	ÖNCE ENJ	30' ÖNCE MELATONİN ENJ	7 VEHICLE İÇEREN SU	GÜN 7 MELATONİNLİ SU	GÜN
GRUP 1	+	-	+	+	+	-	+	-		
GRUP 2	+	-	+	+	-	+	+	-		
GRUP 3	-	+	+	+	+	-	+	-		
GRUP 4	-	+	+	+	-	+	+	-		
GRUP 5	-	+	+	+	+	-	-	+		

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışma ile erkek sıçanlarda, akut tüketici egzersizin kalp kası üzerine olan etkilerinin melatonin hormonu ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla melatonin yoksunluğu oluşturulmuş veya dışarıdan melatonin vermiş gruplara akut tüketici egzersiz yaptırılarak egzersiz sonrası kalp sol ventrikül dokusu ve kan örnekleri alınmıştır. Bu amaçla; kardiyak doku hasarı göstergeleri olarak serum cTnI ve CK-MB düzeyleri, genel yangısel durum göstergeleri olarak PCT, TNF- $\alpha$  ve NF- $\kappa\beta$  seviyeleri ile kalbin iskemik yanıtının belirteci olarak IMA düzeyleri serum örneklerinden, genel yangısel durumun hücresel göstergesi olarak nötrofil, lenfosit ve total lökosit sayıları kan örneklerinden ve sol ventrikül apoptozis uyarımının göstergesi olarak Casp-3 ile inflamasyonun anahtar molekülü olarak TLR-4 gen ekspresyon düzeyleri sol ventrikül dokusunda incelenmiştir. Böylelikle akut tüketici egzersizin kalp sağlığını nasıl etkilediği, kalp hücrelerinde meydana getirdiği hasarın boyutunun ne olduğu ve hem antioksidant hem de antiinflamatuvar bir hormon olan melatonin yoksunluğunun veya ilavesinin belirlenen parametreleri nasıl etkilediği ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Egzersiz normal şartlarda kardiyovasküler sistem için faydalı bir işlemdir. Hem kan basıncı üzerine olan düzenleyici etkisi hem de vücuttaki fazla enerjiyi harcama özelliği ile koruyucu etki oluşturur (Booth ve ark., 2012). Ancak uzun süreli egzersizin özellikle kalp üzerine olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir (Scharhag ve ark., 2008). Özellikle uzun süreli maraton koşucularında veya yoğun ve uzun süreli yüzme sporlarında kalp kası etkilenmektedir. Kalp kasının bu tip egzersizlerde etkilendiğini gösteren bir biyokimyasal belirteçler olarak cTnI ve CK-MB en yaygın olarak kullanılan enzimlerdir. Her iki enzim aynı zamanda miyokardial iskemi, kalp kası hasarı ve kardiyak disfonksiyon oluşan hastalarda artmaktadır (Chiang ve ark., 2000). Benzer şekilde aynı enzimler özellikle uzun süre koşan atletlerde de artış göstermektedir.

Ancak bu artışın klinik olarak karşılığı olan bir kalp hasarı veya hastalığının göstergesi mi olduğu yoksa uzun süre devam eden yorucu veya tüketici egzersize karşı şekillenen fizyolojik bir yanıtın sonucu olarak mı ortaya çıktığı tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle bu alanda halen yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



Uzun süreli devam eden tüketici egzersizlerde kalp veya çizgili kas dokusunu etkileyen temel patolojik süreçler olarak; lokal ve sistemik yangı, kas hasarı ve oksidatif stres dikkat çekmektedir (Davis ve ark., 2007). Hatta bu amaçla egzersiz sonrası kas hasarını engellemek için antiinflamatuvar ajanların kullanım potansiyeli de araştırılmıştır (Lanier 2003).

Melatonin antiinflamatuvar, antiapoptotic ve antioksidan etkileri çok iyi bilinen bir hormondur (Sener 2010). Melatoninin, NF- $\kappa$ B aktivasyonunu inhibe ederek ve proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarını azaltarak ve antioksidan etki göstererek kasları hasardan koruduğu bilinmektedir (Gilad ve ark., 1998; Sasaki ve ark., 2002; Veneroso ve ark., 2009).

Çalışmamızda kalp dokusunda hasarın göstergesi olarak kan cTnI ve CK-MB enzim düzeyleri araştırılmıştır. Bunlardan cTnI düzeyleri tüm gruplarda birbirine yakın değerler göstermiştir. En yüksek cTnI seviyesi grup-4'de belirlenmiş en düşük seviye ise grup-3'te gözlenmiştir. cTnI düzeyleri açısından elde edilen sonuçlar melatonin varlığı veya yoksunluğu ile anlamlı bir ilişki kurulabilecek özellikte bulunmamıştır. Bunun nedeni olarak kan örnekleri alınan zamanda cTnI düzeylerindeki değişimlerin tam olarak ortaya çıkmamış olduğu düşünülebilir. Çünkü cTnI düzeyleri kalp hasarı başladıktan genel olarak yaklaşık 2 saat sonra en yüksek seviyeye ulaşmaktadır (Peela ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda ise egzersiz yaklaşık 45 dakika içinde tamamlanmış ve arkasından hemen kan örnekleri alınmıştır.

Hyun ve ark., (2017) yaptıkları benzer bir çalışmada egzersiz grubunda cTnI seviyelerinin anlamlı düzeyde arttığını belirlemişlerdir. Bu sonuçlar bizim bulgularımız ile çelişiyor gibi görünse de bu çalışmada uygulanan egzersiz süresi 3 saattir ve egzersize dört hafta boyunca devam edilmiştir.

Çalışmamızda kardiyak hasarın bir başka göstergesi olan belirlediğimiz CK-MB düzeylerinin cTnI'ya göre daha değişken olduğu ve melatonin ile ilişkilendirilebilecek sonuçların ortaya koyduğu söylenebilir. Çünkü en düşük CK-MB seviyeleri melatonin verilen gruplarda ortaya çıkmıştır. Bunlardan 4. ve 5. gruplarda elde edilen sonuçlar grup-1'e göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Yine grup-3, grup-1 ile birlikte en yüksek CK-MB seviyelerini göstermiştir.

Grup-1'e SHAM operasyonu yapılmış ve pineal bezi çıkarılmamıştır. Yani fizyolojik düzeyde melatonin salgısının olduğu gruptur. Bu gruba dışarıdan herhangi bir melatonin uygulaması yapılmamıştır. Bu nedenle, grup-1'de CK-MB düzeylerinin yüksek çıkmasının nedeni olarak akut yoğun egzersizde fizyolojik olarak salgılanan melatoninin kalp hasarına karşı koruyucu etki oluşturacak düzeyde olmadığını düşündürmektedir. Diğer taraftan PLT grubundaki CK-MB düzeyleri SHAM grubundan daha düşük çıkmıştır. Bu durum bireysel farklılıklara bağlı açıklanabileceği gibi pineal bez dışı kaynaklardan salgılanan melatoninin koruyucu etkilerine bağlı olarak oluşmuş olabilir. Pineal bez çıkarılınca oluşan oksidatif hasarı azaltmak için melatonin salgılayan diğer kaynaklar aktivitelerini artırmış olabilir.

Akut tüketici egzersizlerde kalp kası hücrelerinin yapısındaki hasara bağlı olarak serum CK, CK-MB ve LDH enzim düzeylerinde önemli derecede artış olduğu belirlenmiştir (Wang ve ark., 2013). Egzersizle birlikte kanda hem CK hem de CK-MB seviyelerinin birlikte arttığı görülmektedir. Bunlardan CK büyük oranda iskelet kasında ortaya çıkar. CK-MB ise kalp kasından kaynaklanan bir enzimdir, dolayısı ile kalp kası hasarlarının bir göstergesidir (Konig ve ark., 2007). Yapılan bir çalışmada maratoncularda ve akut miyokart enfarktüsü geçirmiş hastalarda CK-MB aktivitesindeki artışların yüzde olarak benzerlikler gösterdiği belirtilmiştir. Hatta bu nedenden dolayı egzersiz sonrası miyokart enfarktüsü benzeri ağrı yaşayan birçok insan kalp krizi şüphesi ile hastanelere başvurmakta ve artan kardiyak enzim düzeyleri nedeni ile de tetkik edilmektedir. Bunun yanında bu enzimin kandan uzaklaştırılmasında ise gruplar arasında farklılıklar ortaya çıkmıştır. Örneğin; CK-MB'nin uzaklaştırılması maratoncularda daha yavaştır (Hazar 2004).

Doku hasarı ve yangısal süreçlerin başladığının göstergelerinden biri olarak ölçülen ve değerlendirilen TNF- $\alpha$  seviyeleri açısından çalışmamızda gruplar arasında istatistiksel düzeyde önemli farklılıklar belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında pinealektomi yapılan grupta 16 pg/ml değeri ile en yüksek TNF- $\alpha$  seviyesinin olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra en düşük TNF- $\alpha$  seviyesi ise 6.6 pg/ml ile grup-5'te gözlemlenmiştir. Diğer gruplarda ise ortalama 11-12 pg/ml düzeylerinde TNF- $\alpha$  seviyeleri ortaya çıkmıştır.

Bu sonuçlara göre normal melatonin salgılayan grup ile egzersizden 30 dakika önce melatonin verilen gruplarda TNF- $\alpha$  seviyeleri benzer çıkmıştır. Melatoninin egzersizden 30 dakika önce uygulanması TNF- $\alpha$  düzeylerine etkilememişken bir hafta boyunca uygulanması TNF- $\alpha$  düzeylerinde önemli oranda azalmaya yol açmıştır. Melatonin antioksidan özellikleri olan bir hormondur.

Kalp kası hücrelerinde iskemiye karşı gelişen tolerans, TNF- $\alpha$  inhibitörünün plazma aktivitesindeki artış ve TNF- $\alpha$  konsantrasyonundaki azalma ile gösterilmektedir. Miyokardiyal iskeminin sonucunda mortalite, hemodinamikler, bölgesel miyokardiyal kan akışı ve infarktın boyutunu anlamak için serumda TNF- $\alpha$  ve TNF- $\alpha$  inhibitör aktivitesi önemli rol oynamaktadır (An ve ark., 2016).

Melatonin hem akut egzersizde hem de kardiyovasküler hastalıklarda artan proinflamatuvar sitokinlerin artışını engellediği bilinmektedir (Veneroso ve ark., 2009). Son zamanlarda melatonin üzerine yapılan deneysel çalışmalarda, oksidatif kas hasarı ve tüketici egzersizin neden olduğu hasar üzerinde durulmuştur (Borges ve ark., 2015).

Bu çalışmaların sonucunda melatoninin kas içeriğindeki artmış TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerini azalttığı görülmüştür (Hong ve ark., 2014). Melatonin bu etkisini kas hücresi içerisinde antioksidan savunma enzimlerinin seviyesini artırıp oksidatif stresi baskılayarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Borges ve ark., 2015). Diğer taraftan, melatonin tedavisinin, serum ve kalp kası hücrelerinde artmış durumda olan TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve HMGB1 seviyelerini baskılayarak inflamasyonu önemli derecede azalttığı gösterilmiştir (Belosjorow ve ark., 1999).

Birçok hücrel işlevi etkileyen bir redox transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B seviyeleri açısından çalışmamızda gruplar arasında anlamlı farklılıklar belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre en yüksek NF- $\kappa$ B seviyesi 1. grupta  $887 \pm 101$  pg/mg olarak görülmektedir. Pinealektomi yapıp melatonin uygulaması yapılmayan 3. grupta ve egzersizden 30 dakika önce melatonin enjeksiyon uygulanan 2. grupta NF- $\kappa$ B düzeyleri birbirine yakın iken pinealektomi operasyonu yapıp egzersizden 30 dakika önce melatonin enjeksiyonu yapılan 4. grupta NF- $\kappa$ B düzeyinin  $623 \pm 53$  pg/ml olarak diğer gruplardan daha düşük seviyede olduğu saptanmıştır.

En düşük NF- $\kappa$ B seviyesi ise pinealektomi yapıp gece sularına melatonin eklenen 5. grupta  $603 \pm 173$  pg/ml olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, melatonin yoksunluğunun NF- $\kappa$ B üzerine olan etkisi anlamlı bulunmamışken, dışarıdan ilave melatonin verilmesi NF- $\kappa$ B azaltıcı etki göstermiştir.

NF- $\kappa$ B aktivasyonu kas fibrili atrofisiyle bağdaştırılır (Cai ve ark., 2004; Bar-Shai ve ark., 2008). Yoğun ya da başlangıç seviyesinde egzersiz üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak, egzersizin inflamatuvar yanıtı yeniden düzenlemeyi aktive edebileceği söylenebilir. Yoğunluğa bağlı olarak egzersiz süresince ve egzersiz sonrasında miyokardiyal NF- $\kappa$ B aktivasyonunun arttığını görülmüştür. Egzersiz miyokardiyal NF- $\kappa$ B'yi klasik yolla aktive edebilir (Balan ve Locke, 2010).

Melatonin NF- $\kappa$ B'ye bağlı proinflamatuvar yanıtları azaltır, redoks dengesini ve mitokondriyal homeostazisi düzenler (Garcia ve ark., 2019). Melatonin makrofajlarda, karaciğerde, böbreklerde, akciğer ve kalpte NF- $\kappa$ B aktivasyonunun azaltır. Ayrıca melatonin, inflamatuvar yanıtı proinflamatuvar aşamasında bloke ederek NF- $\kappa$ B'yi inhibe eder. Böylece NF- $\kappa$ B'nin nükleer translokasyonunu bloke etmiş olur (Markus ve ark.,2013).

Çalışmamızda, iskemi sonrasında serumda albüminin modifikasyonu olarak bilinen IMA düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptanmıştır. En yüksek IMA seviyesi pinealektomi operasyonu yapılan 3. grupta  $23.50 \pm 9$  pg/ml düzeyinde görülmüştür. Melatonin salgısının bozulmadığı grup 1 ve pinealektomi operasyonu yapıp gece sularına melatonin eklenen grup 5'te IMA düzeyleri birbirine yakın ve en düşük değere sahiptir. IMA sonuçları üzerinde melatonin ilavesinin her durumda azaltıcı etki gösterdiği anlaşılmıştır.

Koroner arter hastalığının tanısında IMA erken biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. IMA salınımı tüketici egzersizde görülen miyokardiyal iskemi boyunca artar. IMA salınımindaki artışın iskemi-reperfüzyon ya da diğer mekanizmaların koroner kalp akımında azalmasına neden olan oksidatif stresteki artıştan kaynaklandığı gösterilmiştir (Sinha ve ark., 2003).

Geleneksel olarak kalp kası hücre hasarı için bakılan, miyogloblin, CK-MB, cTnI gibi biyobelirteçler hücre hasarından 3-6 saat sonra yükselmektedir. İskemik olmayan kalp hastalıklarında, gastrointestinal hastalıklarda ve immün sistem bozukluklarında IMA artmaz (Can ve Yosunkaya, 2017).

Melatonin oksidatif hasara karşı kalbi reaktif oksijen süpürücü olarak korur. Örneğin; serbest radikal üretimi ve elektron sızıntısını azaltarak mitokondriyal solunum zincirinde yer alabilir. Alzheimer, koroner kalp hastalığı ve kanser gibi ROS içeren birçok hastalıkta melatonin seviyesi sağlıklı bireylere göre düşüktür. Bu kapsamda yapılan sürekli egzersizden sonraki 24-48 saatte IMA düzeyinde artış olduğu görülmüştür (Rodriguez ve ark.,2008).

Kalsitoninin prohormonu olarak bilinen PCT seviyeleri açısından pinealektomi yapılan grupta diğer tüm gruplara göre yaklaşık 3-4 kat daha yüksek düzeyde değer elde edilmiştir. Nitekim, pinealektomi grubunda  $123.21 \pm 48.91$  pg/ml olarak belirlenen PCT düzeyleri diğer gruplarda 18.95-36.02 pg/ml arasında değişmiştir. Bu sonuçlar tüketici egzersizde melatonin yoksunluğu durumlarında PCT düzeylerinde önemli artışlar olduğunu ve melatoninin gerek fizyolojik düzeyde varlığının, egzersizden 30 dakika önce uygulanmasının ve gerekse içme sularına katılarak verilmesinin PCT düzeylerindeki artışları engellediğini göstermiştir.

Düşük lenfosit seviyesi, inflamasyon göstergesi olan lökosit sayısı ve PCT konsantrasyonu arasında önemli bir korelasyon vardır (Banach ve ark., 2018). Enfeksiyon olmadığı durumda PCT, inflamatuvar sitokinler aracılığıyla uyarıldığı düşünülen mononükleer periferik kan hücreleri ve karaciğerden salgılanır (Maisel ve ark.,2012). Ayrıca akut koroner sendromlu hastalarda da PCT seviyesinde artış görülmüştür (Picariello ve ark., 2009; Kelly ve ark., 2010).

Daha önce kalp hasarı geçirip koroner arter hastası olan bireylerde PCT düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. PCT düzeyi daha sonra kalp ölümü gerçekleşen bireylerde bağımsız bir gösterge olarak kullanıldı. Bu bağlamda kalp kası hasarına neden olan iskemi PCT seviyelerini artırmıştır (Sinning ve ark., 2011). Sol ventriküler fonksiyondaki bozukluklar ve akut miyokart infarktüsü gibi olumsuz majör advers olaylar ve PCT arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Kelly ve ark., 2010).

Sürekli ışığa maruz bırakılan sıçanlarda yapılan melatonin çalışmasından elde edilen verilere göre melatonin yoksunluğu sonucunda serum PCT düzeylerinde artış saptanmıştır (Akbulut, 2016). Melatonin-egzersiz ve PCT arasındaki ilişki ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar tüketici egzersizin melatonin yoksunluğunda PCT düzeylerini önemli oranda arttırdığını göstermektedir. Kalple ilgili diğer yangısel ve apoptoz parametreleri ile lökosit sayıları dikkate alındığında bu artışın kalp ile ilgili olmaktan ziyade genel sistemik bir yangısel cevaptan kaynaklandığı düşünülmüştür.

İnsanlarda bu amaçla salgılanan ana hormon kortizol olmasına rağmen sıçanlarda ise CORT'dur. Bu nedenle çalışmamızda kortizol düzeyleri yerine CORT değerlerini belirledik. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde; en yüksek CORT düzeyi fizyolojik düzeyde melatonin salgısı devam eden 1. grupta belirlenmiştir. Pinealektomi grupları olan 3., 4. ve 5. gruplarda CORT seviyesi yüksek ve birbirine yakındır. En düşük CORT düzeyi ise melatonin salgısı bozulmadığı halde egzersizden 30 dakika önce melatonin enjeksiyonu yapılan 2. grupta  $313 \pm 48$  olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar tüketici egzersiz yaptırılan gruplarda melatonin CORT seviyelerindeki değişimlerin melatonin yoksunluğu ile anlamlı bir ilişkisinin olmadığını düşündürmektedir.

Tüketici egzersiz canlılarda hipotalamus-hipofiz-böbrek üstü bezi aksisini aktive ederek CORT salınmasına yol açar (Hau ve ark., 2016). Fizyolojik düzenleyici ağ bileşenleri tarafından düzenlenen homeostazisin, glukokortikoid aracılı strese yanıtta korunduğu bilinmektedir (Cohen ve ark., 2012). Homeostazis glukokortikoid aracılı streste immün sistem dengesi ve oksidatif denge ile korunur. Glukokortikoidlerin immün fonksiyon üzerine baskılayıcı etkisini gösterdiği düşünülmektedir (Apanius 1998).

Fiziksel antrenmanın oluşturduğu akut strese karşı vücudun verdiği otonom yanıt ve hormonal değişimler ortaya konulmuştur. Egzersizin şiddeti ve süresi sporcularda hormonal değişikliklere neden olur. Antremana en hızlı tepki veren hormon ise kortizoldür. Kısa süreli yoğun egzersizler ve uzun süreli submaksimal yoğun egzersizde plazma kortizol seviyesi normalin üç katı fazla olduğu görülmüştür (Erdemir ve Tüfekçioğlu, 2008).

Çark koşusu HPA aksisini değiştirir. Örneğin; sıçan ve farelerde çember koşusu diüurnal aktif periyodun başlangıcında CORT artar (Adlard ve Cotman, 2004; Stranahan ve ark., 2006). Çark koşusu yapan kemirgenlerde tekrarlayan akut stres HPA aksisini değiştirir. HPA aksisindeki bu değişiklik kronik stres (diüurnal CORT) ve strese direnci gösterir (Hare ve ark., 2014). Glukokortikoidler TNF- $\alpha$  seviyesini azaltırlar. Egzersiz dolaşımdaki kortikosteronun seviyesini artırır (Pervaiz ve ark., 2012).

Çalışmamızda tip 1 transmembran proteini olan TLR-4'ün sol ventrikül kasındaki gen ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Egzersizden 30 dakika önce melatonin uygulaması yapılan 2. ve 4. gruplarda melatonin düzeyleri düşük ve aynı seviyede olmasına rağmen 1., 3. ve 4. gruplarda TLR-4 gen ekspresyon seviyeleri birbirine yakın ve yüksek olduğu saptanmıştır. Elde edilen bulgular, tüketici egzersiz yaptırılan sıçanlarda melatoninin varlığı, uygulaması ve yoksunluğunun TLR-4 gen ekspresyon düzeylerini anlamlı bir şekilde etkilemediğini göstermektedir.

TLR-4, NF- $\kappa\beta$ 'nin aktivasyonunu uyarır (Medzhitov ve ark., 1997). Hipoksik stres TLR-4 tarafından düzenlenen inflamatuvar sinyallere makrofajların duyarlılığını artırır (Kim ve ark., 2010). Kalp kasında TLR-4 ekspresyonu 1 haftalık kronik stres sonrasında büyük ölçüde artmıştır (Wang ve ark., 2011). TLR1, TLR2 ve TLR4 ekspresyonu egzersiz sonrası ve dinlenme sırasında elde edilen örneklerle kıyaslandığında 2 saatlik iyileşmeden sonra anlamlı olarak düşüktü. Egzersiz yaptırılmış deneklerin vücut ısısındaki artış egzersizin neden olduğu strese yanıt ve TLR ekspresyonu üzerine egzersizin etkisini incelemeyi mümkün kılmaktadır (Lancaster ve ark., 2005). Egzersizin baskıladığı TLR ekspresyon mekanizmalarının bilinmemesine rağmen dolaşımdaki sitokin düzeylerinin azalması, ısı şoku proteinleri ve glukokortikoidlerin artması TLR baskılanmasını açıklayabilir. Akut uzatılmış aerobik egzersizde TLR ekspresyonunun azalması, dolaşımdaki farklılaşmış monositlerin harekete geçmesinden kaynaklanabilir (Ziegler-Heitbrock 1996). Atletlerde, egzersizin neden olduğu immun baskılama sonucu enfeksiyona duyarlılığın daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

TLR ekspresyonunda uzun süreli azalma, lökositlerin inflamatuvar kapasitesindeki azalmaya neden olan yararlı etkiler ortaya koyabilir. (Gleeson ve ark., 2006). Karaciğerde iskemi reperfüzyon hasarından sonra artan hepatik TLR-4 ekspresyonunu melatonin azaltmıştır (Kang ve ark., 2011; Kang ve ark., 2012). TLR-4 uyarısının düşünülen proinflamatuvar etkileri, şiddetlendirilmiş immun yanıtların varlığında antiinflamatuvar olarak ya da immun baskılayıcı olarak melatoninin etkisini desteklemektedir (Yang ve ark., 2000; Maurız ve ark., 2013).

Çalışmamızda efektör kaspazlardan biri olan ve apoptozisin göstergelerinden biri olarak bilinen kaspaz-3 gen ekspresyonu seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. En yüksek kaspaz -3 ekspresyon düzeyleri pinealektomi yapılan 4. ve 5. gruplarda görülmektedir. En düşük kaspaz-3 seviyesi ise  $0.9994 \pm 0.006$  değerinde kontrol grubu olan 1. grupta olduğu belirlenmiştir. 2. ve 3. grupta ise birbirine yakın kaspaz-3 düzeyleri birbirine yakın bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda melatonin varlığı, uygulaması ve yoksunluğunun tüketici egzersiz yaptırılan sıçanlarda kalp kası kaspaz-3 gen ekspresyonu düzeyleri üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı anlaşılmaktadır.

Sol ventrikülde tüketici egzersiz sonucunda apoptozisi gösteren göstergeler olan kaspaz-3 ve Bax/Bcl-2 oranında artış görülmüştür. Tüketici egzersiz sol ventrikül apoptozisini uyarır ve bunu da mitokondri kaynaklı düzenlemeler yoluyla gerçekleştirir (Huang ve ark., 2009). Kaspaz-3, hücre ölümünden önce kontraktıl disfonksiyona neden olan apoptozisi uyaran miyofibriler proteinleri ayırır (Communal ve ark., 2002; Moretti ve ark., 2002). Miyokard infarktüsünde iskemi reperfüzyondan sonraki birkaç saat içinde apoptozis infarkt bölgesinde tespit edilebilir. Kaspaz-3 aktivasyonu basınca bağlı aşırı yüklenmede son ventrikül disfonksiyonuna neden olur (Philipp ve ark., 2004). Yapısal hasara rağmen, kaspaz-3 farenin kardiyomiyositinde tam bir apoptotik yanıtı tetiklemez (Condorelli ve ark., 2001). Melatonin kalp dokuda, Bcl-2 ekspresyonunu artırırken, Bax ve kaspaz-3 ekspresyonunu azaltmıştır (Zhai ve ark., 2017).



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Melatonin yoksunluğu için yaygın olan pinealektomi operasyonu amacına uygun bir sonuç vermiştir. Melatonin yokluğunda melatoninin aktif rol oynadığı antiinflammatuar ve antiapoptotik etkileri olmayacağından akut yoğun egzersiz sonrasında kalp dokuda oluşan oksidatif hasar artacak ve bunun sonucunda hücre içerisinde hasar yolakları aktifleşecek. Bu yollara melatonin etkisi ne olurdu? Ve nasıl olurdu? Sorularının cevabı bu çalışmada yeteri kadar verilmiştir.

Verilerden de anlaşılacağı üzere, melatonin yoksunluğu oluşturulmuş gruplarda genel olarak hücre hasar parametresi olan CK-MB, oksidatif hasar göstergesi olan IMA, inflammatuar yanıt parametreleri olan TNF- $\alpha$ 'da artış vardır. Bu grubun tüketici egzersiz uygulaması ile kalp hücrelerinde hücre içi etkilerinin anlaşılabilmesi için TLR-4 gen ekspresyonunun seviyelerinin düzeyleri belirlenmiştir. Çalışmamızda caspaz-3 gen ekspresyon düzeylerinin değişmemiş olması kalp kasında apoptozisin henüz başlamadığını düşündürmektedir.

Kalp hücreleri akut yoğun egzersizin neden olduğu oksidatif hasarla zarar görür. Genel olarak antioksidant enzimler her ne kadar bu durumu stabilize etmeye çalışsa da egzersizin türü akut yoğun olduğundan antioksidant enzim müdahalesi yetersiz kalarak bu durum hücre hasarıyla sonuçlanır.

Çalışmanın daha iyi değerlendirilebilmesi için egzersiz uygulaması yapılmayan sedenter gruba ihtiyaç duyulmuştur.

## 7. KAYNAKLAR.

- Abbas AK, Lichtman AH, Poper JS. Cytokines. *Cellular and Molecular Immunology Philadelphia: WB Saunders Company*, (1994): 240-261.
- Adams JM, Cory S. Life or death decisions by the Bcl-2 family. *Trends Biochem Sci*, (2001): 26:61-6.
- Adlard PA, Cotman CW. Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroscience*, (2004):124: 985-992.
- Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome *seas*. *Trends Biochem Sci*, (2001): 26:390-7.
- Ahmadiasl N, Najafipour H, Soufi FG, Jafari A. Effect of short- and long-term strength exercise on cardiac oxidative stress and performance in rat. *J Physiol Biochem*, (2012): 68:121-8.
- Aissou L, Sorbets E, Lallmahomed E, Goudot FX, Pop N, Es-Sebbani S, Benouda L, Nuel G, Meune C. Prognostic and diagnostic value of elevated serum concentration of procalcitonin in patients with suspected heart failure. A review and meta-analysis. *Biomarkers*, (2018): 23:5:407-413.
- Akbulut HF. Melatonin yoksunluğun sepsiste serum prokalsitonin, total oksidan ve antioksidan status ile lökosit, crp ve malondialdehit düzeyleri üzerine etkilerinin araştırılması. *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi*, (2016).
- An R, Zhao L, Xi C, Haixun L, Shen G, Liu H, Zhang S, Sun L. Melatonin attenuates sepsis-induced cardiac dysfunction via a PI3K/Akt-dependent mechanism. *Basic Res Cardiol*, (2016): 111:1:8
- Ao L, Song Y, Fullerton DA, Dinarello CA. The interaction between myocardial depressant factors in endotoxemic cardiac dysfunction: Role of TNF- $\alpha$  in TLR4-mediated ICAM-1 expression. *Cytokine*, (2007): 38:3:124-129.
- Apanius V. Stress and immune defense. *Adv Study Behav*, (1998): 27:133-153.

- Apple F, Quist HE, Otto AP, Mathews WE, Murakami MM. Release characteristics of cardiac biomarkers and ischemia- modified albumin as measured by the albumin cobalt-binding test after a marathon race. *Clin Chem*, (2002): 48:7:1097-100.
- Arendt J, Saunders WB. The pineal gland: Basic physiology and clinical implications. *Endocrinology*. 3rd. ed. Philadelphia. (1995): 433-442.
- Atasoy ÖB, Erbaş O. Physiological effects of melatonin hormone. *FNG & Bil Tıp Derg*, (2017): 3:1:52-62.
- Bakshi TK, Choo MK, Edwards CC, Scott AG, Hart HH, Armstrong GP. Causes of elevated troponin I with a normal coronary angiogram. *Intern Med J*, (2002): 32:11:520-525.
- Balan and Locke M. Acute exercise activates myocardial nuclear factor kappa  $\beta$ . *Cell Stress Chaperon*, (2010): 16:105-111.
- Banach J, Wołowiec L, Rogowicz D, Gackowska L, Kubiszewska I, Gilewski W, Michałkiewicz J, Sinkiewicz W. Procalcitonin (PCT) predicts worse outcome in patients with chronic heart failure with reduced ejection fraction (HFREF). *Dis Markers*, (2018): 2018:1-6:10.1155/2018/9542784.
- Bar-Shai M, Carmeli E, Ljubuncic P, Reznick AZ. Exercise and immobilization in aging animals: The involvement of oxidative stress and NF- $\kappa\beta$  activation. *Free Radic Biol Med*, (2008): 44:202-214.
- Barsness KA, Arcaroli J, Harken AH, Abraham E, Banerjee A, Reznikov L and McIntyre RC. Hemorrhage-induced acute lung injury is TLR-4 dependent. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, (2004): 287:592-599.
- Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem*, (1994): 269:28531-28534.
- Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ and Wyllie AH. Cell death in health and disease: The biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol*, (1995): 6:3-16.
- Belosjorow S, Schulz R, Dorge H, Schade FU, Heusch G. Endotoxin and ischemic preconditioning: TNF- $\alpha$  concentration and myocardial infarct development in rabbits. *Am J Physiol*, (1999): 277:2470-2475.

- Beyaert R, Van Loo G, Heyninck K, Vandenabeele P. Signaling to gene activation and cell death by tumor necrosis factor receptors and Fas. *Int Rev Cytol*, (2002): 214:225-72.
- Biddle SJH: European Perspectives on Exercise and Sport Psychology. UK, *Human Kinetics*, (1995).
- Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic disease. *Compr Physiol*, (2012): 2:1143-1211.
- Borges LS, Dermargos A, Da Silva Junior EP, Weimann E, Lambertucci RH, and Hatanaka E. Melatonin decreases muscular oxidative stress and inflammation induced by strenuous exercise and stimulates growth factor synthesis. *J Pineal Res*, (2015): 58:2:166-172.
- Brydon L, Roka F, Petit L, de CP, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD, Jockers R. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol*, (1999): 13:2025-2038.
- Burtis CA, Ashwood ER ve Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics: *Elsevier Health Sciences*, (2012).
- Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Melendez PA, Oh BC, Lidov HGW, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE. I $\kappa$ b/ NF- $\kappa$ B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell*, (2004): 119:285-298.
- Cakan P, Ozcocer T, Yildiz S. Development and validation of a corticosterone enzyme immunoassay for rat plasma. *Acta Physiol*, (2016): 217:76.
- Calvo J, Boya J. Ultrastructural study of the embryonic development in the rat pineal gland. *Anat Rec*, (1981): 199:543-553.
- Calzado MA, Bacher S, Schmitz ML. NF- $\kappa$ B inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Curr Med Chem*, (2007): 14:367-376.
- Can U ve Yosunkaya S. İskemide Yeni Bir Marker: İskemi Modifiye Albumin. *Koşuyolu Heart J*, (2017): 20:2:148-152:10.5578/khj.10257.
- Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med*, (2008): 205:11:2609-2621.

- Ceraulo L, Ferrugia M, Tesoriere L, Segreto S, Livera MA and Turco Liveri V. Interactions of melatonin with membrane models: Portioning of melatonin in AOT and lecithin reversed micelles. *J Pineal Res*, (1999): 26:2:108-112.
- Cerqueira J, Restan W, Fonseca M, Catananti L, Almeida M, Junior W, Pereira G, Carciofi A, Ferraz G. Intense exercise and endurance-training program influence serum kinetics of muscle and cardiac biomarkers in dogs. *Yrvsc*, (2018): 121:31-39.
- Chiang VW, Burns JP, Rifai N. Cardiac toxicity of intravenous terbutaline for the treatment of severe asthma in children: A prospective assessment. *J Pediatr*, (2000): 137:73-77.
- Chicco AJ, Schneider CM, Hayward R. Exercise training attenuates acute doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol*, (2006): 47:182-189.
- Chindamo<sup>1</sup> S, Buja A, DeBattisti E, Terraneo<sup>1</sup> A, Marini E, Perez<sup>1</sup> LJG, Marconi<sup>1</sup> L, Baldo V, Chiamenti G, Doria M, Ceschin F, Malorgio E, Tommasi M, Sperotto M, Buzzetti R, Gallimberti L. Sleep and new media usage in toddlers. *Eur J Pediatr*, (2019): 179:1-8.
- Cimen B, Turkozkan N, Unlu A. Effects of melatonin on 3-nitro-tyrosine formation and energy charge in rat kidney in LPS-induced stress. *Cell Biochem Function*, (2004): 23:273-277.
- Cobb JP. Nitric oxide synthase inhibition as therapy for sepsis: A decade of promise. *Surg Infect (Larchmt)*, (2001): 2:93-100.
- Cohen AA, Martin LB, Wingfield JC, McWilliams SR, Dunne JA. Physiological regulatory networks: Ecological roles and evolutionary constraints. *Trends Ecol Evol*, (2012): 27:428-435.
- Communal C, Sumandea M, de Tombe P, et al. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, (2002): 99:9: 6252-6256.
- Condorelli G, Roncarati R, Ross J Jr, Pisani A, Stassi G, Todaro M, Trocha S, Drusco A, Gu Y, Russo MA, Frati G, Jones SP, Lefer DJ, Napoli C, Croce CM. Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*, (2001): 98:17: 9977-9982.

- Condorelli G, Roncarati R, Ross JJ, Pisani A, Stassi G, Todaro M, Trocha S, Drusco A, Gu Y, Russo MA, Frati G, Jones SP, Lefer DJ, Napoli C, Croce CM. Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA*, (2001): 98:17:9977-9982.
- Contarteze RVL, Manchado FDB, Gobatto CA, Mello MARD. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp Biochem Physiol*, (2008): 151:3:415-422.
- Covington EW, Roberts MZ, Dong J. Procalcitonin monitoring as a guide for antimicrobial Therapy: A review of current literature. *Pharmacotherapy*, (2018): 38:5:569-581.
- Crespo I, Garcia-Mediavilla MV, Gutierrez B, Sanchez-Campos S, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J. A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pro-inflammatory status of cultured human endothelial cells. *Br J Nutr*, (2008): 100:968-976.
- Çam A, Erdoğan MF. Melatonin. *AU Tıp Fak Mecmuası*, (2003): 56:2:103-112.
- Çavuşoğlu E. Deneysel hipotiroidi oluşturulan ratlarda karaciğer oksidan ve antioksidan sistemler üzerine egzersizin etkileri. Yüksek lisans Tezi. *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, (2013).
- Çolakoğlu S, Kırkalı G, Çolakoğlu M, Örmen M, Akan P. Egzersizde E vitamini desteğinin oksidan stres ve dayanıklılık üzerine etkileri. *Klin Geliş*, (1998): 11:412-415.
- Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Zielinski MR, Groschwitz CM, Brown AS, Gangemi JD, Ghaffar A, Mayer EP. Curcumin effects on inflammation and performance recovery following eccentric exercise-induced muscle damage. *AmJ Physiol-Reg Integr Comp Physiol*. (2007): 292:2168-2173.
- Dawie J, Chawla R, Worku Y, Azazh A. Diagnosis of ischemic heart disease using CK-MB, troponin- I and ischemia modified albumin. *Ethiop Med J*, (2011): 49:1:25-33.
- Demir I, Tüfekçioğlu E; Kortizol sirkadiyen ritmini etkileyen bazı fiziksel ve fizyolojik parametrelerin karşılaştırılması. BAÜ SBED11(20). *Balikesir Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*. (2008): 11:1-10.

- Doğanay S. Akut yorucu egzersiz yaptırılan ratlarda kan ve karaciğer oksidan/antioksidan sistemler üzerine bilberry'nin (Yaban mersini) etkileri. Doktora tezi. *Atatürk Üni Sağ Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye*, (2014).
- Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez MJ, Samimi-Fard S, Reiter RJ, Kaski JC. Association of ischemia-modified albumin and melatonin in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Atherosclerosis*, (2008): 199:73-78.
- Donatto FF, Prestes J, Frollini AB, Palanch AC, Verlengia R, Cavaglieri CR. Effect of oat bran on time to exhaustion, glycogen content and serum cytokine profile following exhaustive exercise. *J Int Soc Sports Nutr*. (2010): 32:1-7.
- Dwaich K, Amran F, Sheibani B, Aubaidy H. Melatonin effects on myocardial ischemia–reperfusion injury: Impact on the outcome in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery. *Int J Cardiol*, (2016): 221:977-986.
- Ebels I ve Balemans MG. Physiological aspects of pineal functions in mammals. *Physiol Rev*, (1986): 66:3:581-605.
- Ekmekcioglu C, Thalhammer T, Humpeler S, Mehrabi MR, Glogar HD, Hölzenbein T, Markovic O, Leibetseder VJ, Strauss-Blasche G, Marktl W. The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. *J Pineal Res*, (2003): 35:1:40-44.
- Ellis RE, Yuan J and Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*, (1991): 7:663-698.
- Emet M, Ozcan H, Ozel L, Yayla m, Halici Z, Hacimuftuoglu A. A Review of Melatonin, its receptors and drugs. *Eurasian J Med*, (2016): 48:135-141.
- Ercument O, Engin S, Mustafa A, Ahmet A. Melatonin: Emeklilik yaşı 80 olur mu? *Turgut Ozal Tıp Merk Derg*, (2000): 7:2:177-187.
- Erdemir I and Tufekcioglu E. The comparison of some physiological and physical parameters affecting cortisol circadian rhythm. *Balıkesir Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, (2008): 11:1-10.
- Eren L ve Dursun A. Gronülomatoz inflamasyon ve etyopatogenezi. *Ank Pat Bült*, (1992): 9:2:83-85.
- Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Ann Rev Immunol*, (1993): 11:571-611.

- Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A, Equils O, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide and IFN- $\gamma$  induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF- $\kappa$ B activation. *J Immunol*, (2001): 166:2018-2024
- Gadaleta MN, Rainaldi G, Lezza AM, Milella F, Fracasso F, Cantatore P. Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats. *Mutat Res*, (1992): 275:181-193.
- Galzin AM, Eon MT, Esnaud H, Lee CR, Pévet P, Langer SZ. Day-night rhythm of 5-methoxytryptamine biosynthesis in the pineal gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Endocrinol*, (1988): 118:3:389-397.
- Ganguly S., Coon S. L. and Klein D. C. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res*, (2002): 309:127-137.
- García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, González-Gallego J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappa B pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol*, (2007): 557:221-229.
- García J, Volt H, Venegas C, Doerrier C, Escames G, López L, Acuña-Castroviejo D. Disruption of the NF- $\kappa$ B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor- $\alpha$  and blocks the septic response in mice. *FASEB J*, (2019): 29:9:3863-3875.
- García JJ, Reiter RJ, Ortiz GG, Oh CS, Tang L, Yu BP, Escames G. Melatonin enhances tamoxifen's ability to prevent the reduction in microsomal membrane fluidity by lipid peroxidation. *J Membr Biol*, (1998): 162:59-65.
- Gendrel D, Bohuon C. Procalcitonin as a marker of bacterial infection. *Pediatr Infect Dis J*, (2000): 19:679-88.
- Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virág L, O'Connor M, Salzman AL, Szabó C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NF- $\kappa$ B activation. *FASEB J*. (1998):12, 685-693.
- Gilmore TD. Introduction to NF- $\kappa$ B: Players, pathways, perspectives. *Oncogene*, (2006): 25:6680-6684.



- Gilmore TD, Wolenski FS. NF- $\kappa$ B: Where did it come from and why? *Immunol Rev*, (2012): 246:14-35.
- Gleeson M, McFarlin B, Flynn M. Exercise and toll-like receptors. *Exerc Immunol Rev*, (2006): 12:34-53.
- Golan J, Torres K, Staskiewicz GJ, Opielak G, Maciejewski R. Morphometric parameters of the human pineal gland in relation to age, body weight and height. *Folia Morphol*, (2002): 61:111-113.
- Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL and Vina J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*, (2005): 15:113-120.
- Greenspan FS, Gardner DG. Basic and clinical endocrinology. *Lange Medical Books/McGraw-Hill*, (2004).
- Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem*, (2002): 2:167-179.
- Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol*, (2011): 93:3:350-384.
- Hare B, Beierle J, Toufexis D, Hammack S and Falls W. Exercise-Associated Changes in the corticosterone response to acute restraint stress: Evidence for increased adrenal sensitivity and reduced corticosterone response duration. *Neuropsychopharmacol*, (2014): 39:1262-1269.
- Hau M, Casagrande S, Ouyang JQ, Baugh AT. Glucocorticoid-mediated phenotypes in vertebrates: Multilevel variation and evolution. *Adv Study Behav*, (2016): 48:41-115.
- Hazar S. Egzersize bağlı iskelet ve kalp kası hasarı. *Sporometre Beden Eğitimi ve Spor Bilimleri Dergisi*, (2004):3:119-126.
- Hewing M. A liquor contacting area in the pineal recess of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Anat Embryol*, (1978): 153:295-304.
- Hoffman RA, Reiter RJ. Pineal gland: Influence on gonads of male hamsters. *Science*, (1965): 148:3677:1609-1611.(a)

- Hoffman RA, Reiter RJ. Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. *Anat Rec*, (1965): 153:1:19-21. (b)
- Hoffman A, Baltimore D. Circuitry of NF- $\kappa$ B signalling. *Immunol Rev*, (2006): 210:171-186.
- Hong Y, Kim JH, Jin Y, Lee S, Park K, Lee Y, Hong Y. Melatonin treatment combined with treadmill exercise accelerates muscular adaptation through early inhibition of CHOP-mediated autophagy in the gastrocnemius of rats with intra-articular collagenase-induced knee laxity. *J Pineal Res*, (2014): 56:2:175-188.
- Horton JW, Maass DL, White J, Sanders B. Myocardial inflammatory responses to sepsis complicated by previous burn injury. *Surg Infect*, (2003): 4:363-377.
- Huang CC, Lin TJ, Chen CC, Lin WT. Endurance training accelerates exhaustive exercise-induced mitochondrial DNA deletion and apoptosis of left ventricle myocardium in rats. *Eur J Appl Physiol*, (2009): 107:697-706.
- Hyun SH, Young MK, Su JP. The effects of preceding exercise on myocardial damage in rats. *J Phys Ther Sci*, (2017): 29:508-510.
- Ianus O, Olnescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative stress. *Rom J Endocrinol*, (1991): 29:147-153.
- Ishikawa Y, Saffitz JE, Mealman TL, Grace AM and Roberts R. Reversible myocardial ischemic injury is not associated with increased creatine kinase activity in plasma. *Clin Chem*, (1997): 43:467-475.
- Jaffe AS. A biomarker odyssey. *Clin Chim Acta*, (1999): 284:2:197-211.
- Jiang J, Borisenko GG, Osipov A, Martin I, Chen R, Shvedova AA, Sorokin A, Tyurina YY, Potapovich A, Tyurin VA, Graham SH, Kagan VE. Arachidonic acid-induced carbon-centered radicals and phospholipid peroxidation in cyclo-oxygenase-2-transfected PC12 cells. *J Neurochem*, (2004): 90:5:1036-1049.
- Juana M, Ruiz M and Hernández-Sánchez P. Oxidative stress and antioxidant defenses induced by physical exercise. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*, (2015): 8:221-241:10.5772/61547.

- Kang JW, Koh EJ, Lee SM. Melatonin protects liver against ischemia and reperfusion injury through inhibition of toll-like receptor signaling pathway. *J Pineal Res*, (2011): 50:403-411.
- Kang JW, Lee SM. Melatonin inhibits type 1 interferon signaling of toll-like receptor 4 via heme oxygenase-1 induction in hepatic ischemia/reperfusion. *J Pineal Res*, (2012): 53:67-76.
- Karlsson S and Ahrén B. Insulin and glucagon secretion in swimming mice: Effects of autonomic receptor antagonism. *Metabolis*, (1990): 39:7:724-732.
- Kayatekin B.M. ve Şemin İ. Fare ve sıçanlar için koşu bandı antrenman ve test protokolleri. *Spor Hekim Derg.* (2003): 38:19-28.
- Kelly D, Khan SQ, Dhillon O, Quinn P, Struck J, Squire IB, Davies JE, Ng LL. Procalcitonin as a prognostic marker in patients with acute myocardial infarction. *Biomarkers*, (2010): 15:4:325-331.
- Kerr JF, Wylie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, (1972): 26:239-257.
- Kılıç Erkek Ö. Spontan hipertansif sıçanlarda egzersiz ve onu izleyen egzersizi bırakma (detraining) sürecinin hemoreolojik parametreler üzerine etkisi. Yüksek lisans tezi. *Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.* (2014). Denizli, Türkiye.
- Kim DS, Kim HR, Woo ER, Kwon DY, Kim MS, Chae SW, Chae HJ. Protective effect of calceolarioside on adriamycin-induced cardiomyocyte toxicity. *Eur J Pharmacol* (2006): 541:24-32.
- Kim SY, Choi YJ, Joung SM, Lee BH. Hypoxic stress up-regulates the expression of toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor. *Immunology*, (2010): 129:516-524.
- Kirchhof P, Fabritz L, Fortmuller L, Matherne GP, Lankford A, Baba HA, Schmitz W, Breithardt G, Neumann J and Boknik P. Altered sinus nodal and atrioventricular nodal function in freely moving mice overexpressing the A1 adenosine receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, (2003): 285:145-153.
- Klein DC. Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found Symp*, (1985): 117:38-56.

- Klein DC, Moore RY and Reppert SM. Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock. *Oxford University Press, New York* (1991).
- Korkmaz A, Öter Ş. Hipertansiyon tedavisinde egzersiz ve diyetin rolü. *T Klin Tip Bilimleri*, (1998): 18:213-219.
- König D, Neubauer O, Nics L, Kern N, Berg A, Bisse E, Wagner KH. Biomarkers of exercise- induced myocardial stress in relation to inflammatory and oxidative stress. *Exerc Immunol Rev.* (2007): 13:15-36.
- Kretzmann NA, Fillmann H, Mauriz JL, Marroni CA, Marroni N, González-Gallego J, Tuñón MJ. Effects of glutamine on pro-inflammatory gene expression and activation NF- $\kappa$ B of and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*, (2008): 100:968-976.
- Krzych K, Golab K, Pstras J, Knapik P. Predicting outcome after cardiac arrest with serum S-100B protein and procalcitonin. *Eur J Anaesthesiol*, (2017): 24:845-856.
- Kumar CT, Reddy VK, Prasad M, Thyagaraju K, Reddanna P. Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Mol Cell Biochem*, (1992): 111:109-115.
- Kumar V, Abbar A, Aster J. Robin's Temel Patoloji. *Elsevier Inc.* (2013): 2-17.
- Kuralay F, Çavdar Z. İnflamatuvar medyatörlere toplu bir bakış. *Gen Tip Derg*, (2006): 16:3:143-152.
- Kwak HB. Effects of aging and exercise training on apoptozis in the heart. *Journ of exer Reh*, (2013): 9:2:212-219.
- Lancaster GI, Khan Q, Drysdale P, Wallace F, Jeukendrup AE, Drayson MT and Gleeson M. The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *J Physiol*, (2005): 563:3:945-955.
- Lanier BA. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs following exercise-induced muscle injury. *Sports Med*, (2003): 33:177-185.
- Lawrence T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, (2009): 1:6:1-10.

- Le Page C, Noirez P, Courty J, Riou B, Swynghedauw B, Besse S. Exercise training improves functional post-ischemic recovery in senescent heart. *Exp Gerontol*, (2009): 44:3:177-182.
- Lee IM, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: An analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet*, (2012): 380:219-229.
- Lee YM, Chen HR, Hsiao G, Sheu JR, Wang JJ, Yen MH. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *J Pineal Res*, (2002): 33:2:72-80.
- Leeson TS, Leeson CR, Papa AA, Saunderson WB. Melatonin. *Text/Atlas of Histology*, (1985): 594-596.
- Lemos JA. Increasingly sensitive assays for cardiac troponins: A review. *JAMA*, (2013): 309:21:2262-2269.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee Y, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*, (1958): 80:2587.
- Lerner AB, Case JD, Heinzelmann RV. Structure of melatonin. *J Am Chem Soc*, (1959): 81:6084.
- Lew MJ, Flanders S. Mechanisms of melatonin-induced vasoconstriction in the rat tail artery: A paradigm of weak vasoconstriction. *Br J Pharmacol*, (1999): 126:6:1408-1418.
- Lindström TM, Bennett PR. The role of NF- $\kappa$ B in human labour. *Reproduction*, (2005): 130:569-581.
- Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML. MT1 and MT2 melatonin receptors: A therapeutic perspective. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, (2016): 56:361-383.
- Lotzerich H, Fehr HG, Appel HJ. Potentiation of cytostatic but not cytolytic activity of murine macrophages after running stress. *Int J Sports Med*, (1990): 11:61-65.
- Macias M, Escames G, León J, Coto-Montes A, Sbihi Y, Osuna A, Acuña-Castroviejo D. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem*, (2003): 270:5:832-840.
- Mair J, Artner-Dworzak E, Lechleitner P, Morass B, Smidt J, Wagner I, Dienstl F, Puschendorf B. Early diagnosis of acute myocardial infarction by a newly developed rapid immuno-turbidimetric assay for myoglobin. *Br Heart J*, (1992): 68:5:462-468.

- Maisel AS, Choudhary R. Biomarkers in acute heart failure: State of the art. *Nat Rev Cardiol*, (2012): 9:8:478-490.
- Maisner M. Procalcitonin-a new, innovative infection parameter biochemical and clinical aspects. *3. revised and expanded edition*, (Thieme, Stuttgart, New York), (2000).
- Markus R, Cecon E and Pires-Lapa M. Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. *Int J Mol Sci*, (2013): 14:10979-10997.
- Maronde E and Stehle JH. The mammalian pineal gland: Known facts, unknown facets. *Trends Endocrinol Metab*, (2007): 18:142-149.
- Marsh EE, Biller J, Adams HP, Marler JR, Hulbert JR, Love BB, Gordon DL. Circadian variation in onset of acute ischemic stroke. *Arch Neurol*, (1990): 47:11:1178-1180.
- Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: Recent insights and new perspectives. *J Pineal Res*, (2013): 54:1:1-14.
- McCormick CM, Mathews IZ. Adolescent development, hypothalamic-pituitary-adrenal function, and programming of adult learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, (2010): 34:5:756-765.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Charles A, Janeway Jr. A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. (1997): 388:394-397.
- Meissl H, Nakamura T, Thiele G. Neural response mechanisms in the photo-receptive pineal organ of goldfish. *Comp Biochem Phys A*, (1986): 84:3:467-473.
- Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor mediated apoptosis via two sequential signalin complexes. *Cell*, (2003): 114:181-190.
- Miller TD, Rogers PJ, Bauer BA, O'Brien JF, Squires RW, Bailey KR, Bove AA. Does exercise training alter myocardial creatine kinase MB isoenzyme content? *Med Sci Sports Exerc*, (1989): 21:4:437-440.

- Moretti A, Weig HJ, Ott T, Seyfarth M, Holthoff HP, Grewe D, Gillitzer A, Bott-Flügel L, Schömig A, Ungerer M and Laugwitz KL. Essential myosin light chain as a target for caspase-3 in failing myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA*, (2002): 99:18:11860-11865.
- Muller JE. Circadian variation in cardiovascular events. *Am J Hypertens*. (1999): 12:35-42.
- Murray LA, Knight DA, McAlonan L, Argentieri R, Joshi A, Shaheen F, Cunningham M, Alexopolou L, Flavell RA, Sarisky RT, Hogaboam CM. Deleterious role of TLR3 during hyperoxia- induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. (2008): 178:12:1227-1237.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper'in Biyokimyası. *Bariş kitabevi*, (1998): 24:24-68.
- Narin F, Basarslan F, Akgun H, Akın A, Baykan A, Saraymen R, Kuzuguden S, Yavascan S. The effects of melatonin on the myocardial damage, induced by hypoxia. *EÜJ Health Sci*, (2004): 13:1:64-72.
- Nduhirabandi F and Maarman GJ. Melatonin in heart failure: A promising therapeutic strategy. *Molecules*, (2018): 23:7:1819.
- Nomura N, Miyajima N, Sazuka T, Tanaka A, Kawarabayasi Y, Sato S, Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Tabata S. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. 1. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res*, (1994): 1:1:27-35.
- Nororiha IL, Niemir Z, Stein H, Waldher R. Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, (1995): 10:775-786.
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefou- lon F, Fauchere JL, Delagrance P, Canet E, Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*, (2000): 275:31311-31317.
- Oczenski W, Fitzgerald RD, Schwarz S. Procalcitonin: A new parameter for the diagnosis of bacterial infection in the peri-operati- ve period. *Eur J Anaesthesiol*, (1998): 15:202-209.

- Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll- like receptor-4 complex. *J Immunol*, (2000): 164:558-561.
- Ojeda ML, Ambrosiani J, Tavares E, Maldonado R, Minano FJ. Identification and localization of procalcitonin-like immunoreactivity in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett*, (2006): 408:40-45.
- Ooi DS, Isotalo PA and Veinot JP. Correlation of antemortem serum creatine kinase, creatine kinase-MB, troponin I, and troponin T with cardiac pathology. *Clin Chem*, (2000): 46:338-344.
- Ortega E, Rodriguez MJ, Barriga C, Forner MA. Corticosterone, prolactin and thyroid hormones as hormonal mediators of the stimulated phagocytic capacity of peritoneal macrophages after high-intensity exercise. *Int J Sports Med*, (1996): 17:149-155.
- Ostrowski K, Rhode T, Asp S, Schjerling P and Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol*, (1999): 515:1:287-291.
- Ovali MA, Uzun M. The effects of melatonin administration on KCNQ and KCNH2 gene expressions and QTc interval in pinealectomised rats. *Cell Mol Biol*, (2017): 63:3:45-50.
- Oyama J, Blais C Jr, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T. Reduced myocardial ischemia- reperfusion injury in toll- like receptor 4 deficient mice. *Circulation*, (2004): 109:6:784-789.
- Pant S, Deshmukh A, Neupane P, Kumar MPK and Vijayashankar CS. Lakshmanadoss U (Ed.). 2 cardiac biomarkers. Novel strategies in ischemic heart disease. *Intech*, (2012): 17-42.
- Papassotiriou I, Alexiou VG, Tsironi M, Skenderi K, Spanos A, Falagas ME. Severe aseptic inflammation caused by long distance running (246 km) does not increase procalcitonin. *Eur J Clin Invest*, (2008): 38:4:276-279.
- Paweletz N and Flemming W. Pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol*, (2001): 2:1:72-75.
- Pedersen BK and Saltin B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports 16 (Suppl 1)*, (2006): 1:3-63.



- Peela JR, Jarari A, Hail A, Rawall AK, Kolla SD, Sreekumar S, Khurana L, Sidhanathi NR. Cardiac biomarkers: The troponins and CK- MB. *Ibnosina J Med BS*, (2010): 2:5:190-197.
- Pervaiz N and Hoffman-Goetz L. Immune cell inflammatory cytokine responses differ between central and systemic compartments in response to acute exercise in mice. *Send to Exerc Immunol Rev*, (2012): 18:142-157.
- Petit L, Lacroix I, de CP, Strosberg AD, Jockers R. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol*, (1999): 58:4:633-639.
- Pevet P, Klosen P, Felder-Schmittbuhl MP. The hormone melatonin: Animal studies. *Best Pract Res Cl En*, (2017): 31:6:547-559.
- Philipp S, Pagel I, Höhnel K, Lutz J, Buttgerit J, Langenickel T, Hamet P, Dietza R, Willenbrock R. Regulation of caspase 3 and Fas in pressure overload-induced left ventricular dysfunction. *Eur J Heart Fail*, (2004): 6:7:845-851.
- Picariello C, Lazzeri C, Chiostrri M, Gensini G, Valente S. Procalcitonin in patients with acute coronary syndromes and cardiogenic shock submitted to percutaneous coronary intervention. *Intern Emerg Med*, (2009): 4:5:403-408.
- Powers KA, Szaszi K, Khadaroo RG, Tawadros PS, Marshall JC, Kapus A, Rotstein OD. Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll- like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *J Exp Med*, (2006): 203:1951-1961.
- Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*, (2008): 44:193-201.
- Prabhu SD. Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circ Res*, (2004): 95:1140-1153.
- Quay WB. Volumetric and cytologic variation in the pineal body of peromyscus leucopus (Rodentia) with respect to sex, captivity and day-length. *J Morphol*, (1956): 98:471.
- Ramasamy I. Biochemical markers in acute coronary syndrome. *Clinica Chimica Acta journal*, (2011): 412:1279-1296.
- Reiter RJ, Hester RJ. Interrelationships of the pineal gland, the superior cervical ganglia and the photoperiod in the regulation of the endocrine systems of hamsters. *Endocrinology*, (1965): 79:6:1168-1170.

- Reiter RJ. Melatonin: That ubiquitously-acting pineal hormone. *News Physiol Sci*, (1991): 6:223-227.
- Reiter RJ, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A: Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci*, (1997): 60:25:2255-2271.
- Reiter RJ, Fuentes-Broto L, Tan DX. Melatonin: A multitasking molecule. *Prog Brain Res*, (2010): 181:127-151.
- Reiter JR, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM. Melatonin as an antioxidant: Under promises but over delivers. *J Pineal Res*, (2016): 61:253-278.
- Reiter RJ, Mayo J, Tan D, Sainz R, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: Under promises but over delivers. *J Pineal Res*, (2016): 61:253-278.
- Reiter RJ, Tan DX, Lucien C. Manchester. CSF generation by pineal gland results in a robust melatonin circadian rhythm in the third ventricle as an unique light/dark signal. *Medical Hypotheses*, (2016): 86:3-9.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J Pineal Res*, (2004): 36:1:1-9.
- Sahna E, Parlakpınar H, Turkoz Y, Acet A. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion induced infarct size and oxidative damage. *Physiol Res*, (2005): 54:491-495.
- Sahna E, Türk G, Atessahin A, Yılmaz S, Olmez E. Remote organ injury induced by myocardial ischemia and reperfusion on reproductive organs and protective effect of melatonin in male rats. *Fertil Steril*, (2007): 88:1:188-192.
- Salie R, Harper I, Cillie C, Genade S, Huisamen B, Moolman J, Lochner A. Melatonin protects against ischaemic-reperfusion myocardial damage. *J Mol Cell Cardiol*, (2001): 33:2:343-357.
- Salmana H, Bergmana M, Besslerb H, Weissa J, Punskyb I, Djaldettib M. Effect of training on the phagocytic capacity of peritoneal macrophages from rats exposed to swim stress. *Acta Haematol*, (1999):102:4:180-184.
- Samuel AA and Toriola AL. Effect of different running programmes on body fat and blood pressure in schoolboys aged 13-17 years. *J Sport Med Phys Fit*, (1988): 28:3:267-273.

- Sasaki M, Jordan P, Joh T, Itoh M, Jenkins M, Pavlick K, Minagar A and Alexander SJ. Melatonin reduces TNF- $\alpha$  induced expression of MAdCAM-1 via inhibition of NF- $\kappa$ B. *BMC Gastroenterol*, (2002): 2:9:1-5.
- Scharhag J, George K, Share R, Urtlausen A, Kindermann W. Exercise-associated increases in biomarkers. *Med Sci Sport Exer*, (2008): 40:8:1408-1415.
- Seithikurippu P, BaHammam A, Ojike N, Akinseye O, Kendzerska T, Buttoo K, Dhandapany P, Brown G, Cardinali D. Melatonin and human cardiovascular disease. *J Cardiovasc Pharm T*, (2017): 22:2:122-132.
- Sener G. Karanlığın hormonu: Melatonin. *Marmara Med J*, (2010): 14:112-120.
- Shave R, George K, Gaze D. The influence of exercise upon cardiac biomarkers: a practical guide for clinicians and scientists. *Curr Med Chem*, (2007): 14:13:1427-1436.
- Sheehan P, Vasikaran SD. The evolving clinical role of cardiac troponins and new acute miyokardial infarction guidelines: Implications for the clinical laboratory. *Clin Biochem Rev*, (2001): 23:52-65.
- Sinha MK, Gaze DC, Tippins JR, Collinson PO, Kaski JC. Ischemia modified albumin is a sensitive marker of myocardial ischemia after percutaneous coronary intervention. *Circulation*, (2003): 107:2403-2405.
- Sinha MK, Roy D, Gaze DC, Collinson PO, Kaski JC. Role of "ischemia modified albumin", a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg Med J*, (2004): 21:1:29-34.
- Sinning CR, Sinning JM, Schulz A Schnabel RB, Lubos E, Wild PS, Papassotiriou J, Bergmann A, Blankenberg S, Munzel T, Bickel C. Association of serum procalcitonin with cardiovascular prognosis in coronary artery disease. *Circ J*, (2011): 75:5:1184-1191.
- Skinner DC, Malpoux B. High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology*, (1999): 140:4399-4405.
- Sloan AW and Weir JB. Nomograms for prediction of body density and total body fat from skinfold measurements. *J Appl Psychol*, (1970): 28:221.

- Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS and Slominskib AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol*, (2012): 351:2:152-166.
- Slu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardial musles. *Feseb J*, (2004): 18:1150-1152.
- Smith DG, Schenk MP. Dissection guide and atlas to the rat. *1. edition*, (2001).
- Sobel BE, Larson KB, Markham J and Cox JR. Empirical and physiological models of enzyme release from ischemic myocardium. In computers in cardiology. *IEEE Computer Society*, (1975).
- Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, Van HFA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, Jong S. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem*, (2004): 52:6:821-831.
- Stephen C, Kolwicz Jr. An exercise in cardiac metabolism. *Front Cardiovasc Med*, (2018): 7:5:1-11.
- Stranahan AM, Khalil D, Gould E. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. *Nat Neurosci*, (2006): 9:526-533.
- Suzuki K. Cytokine response to exercise and its modulation. *Antioxidants*, (2018): 7:1:17.
- Szarszoi O, Asemu G, Vanecek J, Ostadal B, Kolar F. Effects of melatonin on ischemia and reperfusion injury of the rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther*, (2001): 15:251-257.
- Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE, Testa JR. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the drosophila transmembrane receptor toll, to human chromosome 4p14. *Genomics*, (1996): 32:486-488.
- Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P, Malpoux B. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology*, (2002): 143:84-90.
- Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: Actions and mechanisms of action. *Physiol Rev*, (1999): 79:1:1-71.
- Ustundag B, Canatan H. Melatonin: Guclu bir antioksidan ve serbest radikal giderici. *Firat Tip Der*, (1999): 1:7.
- Vasalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann Review of Immunology*, (1992): 10:411-452.

- Veneroso C, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J, Collado PS. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *J Pineal Res*, (2009): 47:2:184-191.
- Walker HK, Hall WD, Hurst JW (Ed). Clinical methods: The history, physical, and laboratory examinations. 3rd edition. Boston: Butterworths, (1990).
- Wang R, Yao Q, Xiao Y, Zhu S, Yang L, Feng J, Li D, Li X, Wu J and Chen J. Toll-like receptor 4/ NF- $\kappa$ B pathway is involved in myocardial injury in a rat chronic stress model. *Stress*, (2011): 14:5:567-575.
- Wang Y, Xu P, Wang Y, Liu, H Zhou Y, and Cao. X. The protection of salidroside of the heart against acute exhaustive injury and molecular mechanism in rat. *Oxid Med Cell Longev*, (2013): 1-8:10.1155/2013/507832.
- Welsh MG, Reiter RJ. The pineal gland of the gerbil, meriones unguiculatus. 1. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res*, (1978): 193:323-336.
- Wonders KY, David S, Hydock DS, Hayward R. Time-course of changes in cardiac function during recovery after acute exercise. *Appl Physiol Nutr Metab*, (2007): 32:1164-1169.
- Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, Alexander SI, Sharland AF, Chadban SJ. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest*, (2007): 117:2847-2859.
- Wullaert A, Heyninck K, Beya R. Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF- $\kappa$ B and JNK activation in hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, (2006): 72:9:1090-1101.
- Wurtman RJ, Axelrod J, Fischer JE. Melatonin synthesis in the pineal gland: Effect of light mediated by the sympathetic nervous system. *Science*, (1964): 143:1328.
- Wurtman RJ and Axelrod J: The pineal gland. *Sci Am*, (1965): 213:1:50-60.
- Yang H, Young DW, Gusovsky F, Chow JC. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1. *J Biol Chem*, (2000): 275:27:20861-20866.
- Yang X, Coriolan D, Murthy V, Schultz K, Golenbock DT, Beasley D. Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: Role of efficient toll-like receptor 4 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, (2005): 289:1069-1076.

- Yazıcı C ve Köse K. Melatonin: The antioxidant power of darkness. *EU J Heal Sci*, (2004): 13:2:56-65.
- Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B (Ed.). Moleküler biyoloji. İstanbul. *Nobel Kitap Dağıtım*, (2010).
- Yoshimura A, Shimomura Y, Murakami T, Ichikawa M, Nakai N, Fujitsuka C, Kanematsu M and Fujitsuka N. Glycogen depletion of the intrafusal fibers in a mouse muscle spindle during prolonged swimming. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, (1996): 271:398-408.
- Young ME. The circadian clock within the heart: potential influence on myocardial gene expression, metabolism, and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, (2006): 290:1-16.
- Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, Katus HA, Heine H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res*, (2002): 56:126-134.
- Zhai M, Li B, Duan W, Jing L, Zhang B, Zhang M, Yu L, Liu Z, Yu B, Ren K, Gao E, Yang Y, Liang H, Jin Z, Yu S. Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through SIRT3-dependent regulation of oxidative stress and apoptosis. *J Pineal Res*, (2017): 63:2:12419:10.1111/jpi.12419.
- Zhou H, Ma Q, Zhu P, Ren J, Reiter RJ, Chen Y. Protective role of melatonin in cardiac ischemia-reperfusion injury: From pathogenesis to targeted therapy. *J Pineal Res*. (2018): 64:3:10.1111/jpi.12471.
- Ziegler-Heitbrock HW. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> subpopulation. *Immunol Today*, (1996): 17:424-428.

**EK-1 Gruplara ait istatistiksel veriler ve standart sapmalar.**

<b>Lökosit</b>		
<b>GRUPLAR</b>	<b>İstatistik</b>	<b>± Standart sapma</b>
GRUP 1	11383	1272
GRUP 2	11321	1693
GRUP 3	16936	920
GRUP 4	8493	480
GRUP 5	10136	862

<b>CORT</b>		
<b>GRUPLAR</b>	<b>İstatistik</b>	<b>± Standart sapma</b>
GRUP 1	515	86
GRUP 2	313	48
GRUP 3	413	58
GRUP 4	488	102
GRUP 5	421	68

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>		
<b>GRUPLAR</b>	<b>İstatistik</b>	<b>± Standart sapma</b>
GRUP 1	12	1,29
GRUP 2	12	0,64
GRUP 3	16	8,08
GRUP 4	12	2,89
GRUP 5	6	0,54

<b>NF-<math>\kappa\beta</math></b>		
<b>GRUPLAR</b>	<b>İstatistik</b>	<b>± Standart sapma</b>
GRUP 1	887	101
GRUP 2	786	115
GRUP 3	781	83
GRUP 4	623	53
GRUP 5	603	173

<b>PCT</b>		
<b>GRUPLAR</b>	<b>İstatistik</b>	<b>± Standart sapma</b>
GRUP 1	36,02	6,65
GRUP 2	27,03	6,20
GRUP 3	123,21	48,91
GRUP 4	23,74	6,85
GRUP 5	18,95	5,93

<b>CK-MB</b>		
<b>GRUPLAR</b>	<b>İstatistik</b>	<b>± Standart sapma</b>
GRUP 1	240	28,54
GRUP 2	164	16,88
GRUP 3	194	17,14
GRUP 4	138	8,710
GRUP 5	153	33,53
<b>cTnI</b>		
<b>GRUPLAR</b>	<b>İstatistik</b>	<b>± Standart sapma</b>
GRUP 1	13,85	0,89
GRUP 2	12,77	0,86
GRUP 3	12,80	0,82
GRUP 4	16,34	1,40
GRUP 5	14,41	1,10
<b>IMA</b>		
<b>GRUPLAR</b>	<b>İstatistik</b>	<b>± Standart sapma</b>
GRUP 1	5,64	1,50
GRUP 2	2,78	0,72
GRUP 3	23,50	9,19
GRUP 4	13,09	4,15
GRUP 5	3,19	0,86
<b>TLR-4</b>		
<b>GRUPLAR</b>	<b>İstatistik</b>	<b>± Standart sapma</b>
GRUP 1	1,0098	0,0448
GRUP 2	0,7633	0,0469
GRUP 3	1,0417	0,1127
GRUP 4	0,7668	0,0773
GRUP 5	1,1848	0,0420
<b>Kaspaz-3</b>		
<b>GRUPLAR</b>	<b>İstatistik</b>	<b>± Standart sapma</b>
GRUP 1	0,9994	0,006
GRUP 2	1,1127	0,042
GRUP 3	1,1105	0,107
GRUP 4	1,1974	0,059
GRUP 5	1,3290	0,050



## EK-2 ETİK KURUL ONAY FORMU




T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI


TOPLANTI TARİHİ :27.03.2017  
TOPLANTI SAYISI :2017/04  
DOSYA KAYIT NUMARASI :2017/10271  
KARAR NUMARASI :2017/04-13  
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR :Kübra SAFİ  
HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI :Wistar cinsi siçan – 35 + 10\*

Prof. Dr. Metehan UZUN, tarafından Etik Kurulumuza sunulan "Akut Yoğun Egzersiz Yapırılmış Erkek Siçanlarda Bazı Yangısal Belirteçler Ve Kalp Hasarı Üzerine Melatoninin Etkilerinin Araştırılması" başlıklı proje Hayvan Deneylerine ilişkin mevzuatın emirleri doğrultusunda incelenerek, ilgili mevzuat hükümleri çerçevesinde Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna; oybirliği ile karar verilmiştir.

  
Prof. Dr. Ali İŞMEN  
Üye  
(Başkan)

  
Prof. Dr. Yoneş YÜCEER  
Üye

Doç. Dr. Murat TOSUNOĞLU  
Üye  
(Görevli -İzinli)

  
Yrd. Doç. Dr. Cemil TÖLÜ  
Üye

  
Yrd. Doç. Dr. Başak BÜYÜK  
Üye

  
Yrd. Doç. Dr. Çimen AKMAN  
Üye

  
Yrd. Hek. Saftı ELMAS  
Üye

  
Tayfun TAŞBİLEK  
Sivil Üye

  
Erdoğan GÜRSEL  
Sivil Üye

## EK-3 ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	KÜBRA	Soyadı	SAFİ
Doğum Yeri	EMİNÖNÜ	Doğum Tarihi	11.02.1991
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	19460004374
E-mail	kubrasafi@gmail.com	Tel	(505)0677900

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2015-2019
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2010-2014

### İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Saha destek elemanı	Monitör Medikal Araştırma Ve Danışmanlık Ltd. Şti.	-2016-2017
2.	Biyokimya Teknikeri	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Hastanesi	-2012-2013

### Yabancı Dil Sınav Notu<sup>#</sup>

KPDS	YÖK DİL	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE
	81,75							

<sup>#</sup> Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır<sup>#</sup> KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; YDS: Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

#### EK-4 SPİRALLİ TEZ KONTROL FORMU

	Evvet	Hayır
1) Amblem renkli ve 2x2 cm boyutunda olmalıdır.	X	
2) Kapakta sadece başlık bold ve 14 punto, diğer yazılar normal renkte ve 12 punto yazılmalıdır.	Y	
3) Tez savunma sınavında kabul edilmiş tezler için, tezin sırtı tez yazım kılavuzuna uygun olarak düzenlenmiş olmalıdır.	d	
4) Kabul edilmiş tez konusu ile tezin baş sayfasındaki tez konusu aynı olmalıdır.	d	
5) Beyan eksiksiz ve imzalı olarak Tez Yazım Kılavuzundaki gibi konmalıdır.	d	
6) Özet ve Summary 250'şer kelimeyi aşmamalıdır. (1 sayfa)	h	
7) Anahtar kelimeler (en fazla) 5 adet olmalıdır.	d	
8) İngilizce özetin başında konu başlığı yazılmalıdır.	d	
9) Metin ve kaynakların tümü 1,5 aralıklı olmalıdır.	h	
10) Tezde yazım karakteri olarak "Times New Roman" kullanılmalıdır.	d	
11) Web sayfa kaynakları metin içinde de geçmelidir (parantez içinde güncelleme tarihi ile birlikte). Kaynaklar bölümünde de cümlelerin en sonunda Erişim adresi ve Erişim tarihi sırasıyla verilmelidir.	d	
12) Çalışmanın Etik Kurul onayı, varsa kurum onayı tezin en arkasına konmalıdır.	d	

Tarih: 28/02/2019 Öğrenci Adı ve Soyadı, Dünya SAFI İmza	Tarih: 28/02/2019 Prof. Dr. Mehmet Uzun Danışmanın Adı ve Soyadı, İmza
--	--

**EK-5 ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ SİRALLI/CİTLİ TEZ YAZIM**  
**KONTROL LİSTESİ**

KONTROL BAŞLIĞI	ÖĞRENCİ	DANIŞMAN
Tez yazımında kullanılan yazı tipi	✓UYGUN	✓UYGUN
Sayfa kenar boşlukları	✓UYGUN	✓UYGUN
Kapak sayfası düzeni	✓UYGUN	✓UYGUN
İç kapak sayfası düzeni	✓UYGUN	✓UYGUN
Onay sayfası düzeni	✓UYGUN	✓UYGUN
Beyan sayfası içeriği ve düzeni	✓UYGUN	✓UYGUN
İçindekiler sayfası düzeni	✓UYGUN	✓UYGUN
Teşekkür sayfası	✓UYGUN	✓UYGUN
Türkçe özet	✓UYGUN	✓UYGUN
İngilizce özet	✓UYGUN	✓UYGUN
Simgeler ve kısaltmalar dizini	✓UYGUN	✓UYGUN
Şekiller dizini	✓UYGUN	✓UYGUN
Tablolar dizini	✓UYGUN	✓UYGUN
Tezim ön sayfalarının sıralaması	✓UYGUN	✓UYGUN
Ön sayfaların numaralandırılması	✓UYGUN	✓UYGUN
Sayfalarının numaralandırılması	✓UYGUN	✓UYGUN
Başlıklarının numaralandırılması	✓UYGUN	✓UYGUN
Şekil, resim ve tablo numaralandırması	✓UYGUN	✓UYGUN
Yöntem ve Gereç	✓UYGUN	✓UYGUN
Bulgular	✓UYGUN	✓UYGUN
Tartışma	✓UYGUN	✓UYGUN
Sonuç ve Öneriler	✓UYGUN	✓UYGUN
Kaynaklar	✓UYGUN	✓UYGUN
Atıflar (alıntı ve göndermeler)	✓UYGUN	✓UYGUN
Ekler (etik kurul onayı, vs)	✓UYGUN	✓UYGUN
Tez planı	✓UYGUN	✓UYGUN
Dil (anlatım, yazım -imla)	✓UYGUN	✓UYGUN
Kâğıt ve baskı özelliği	✓UYGUN	✓UYGUN
Tezim son şeklinin elektronik kopyası	✓UYGUN	✓UYGUN
Tarih: 28.02 / 2019 Öğrenci Adı ve Soyadı: Kubra SAFI İmza:	Tarih: 28.02 / 2019 Danışmanın Adı ve Soyadı: Prof. Dr. Mehmet Uzun İmza:	