



**T.C.**  
**GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK DOZ METİLPREDNİZOLONUN TAVŞAN KALP  
DOKUSUNDA OLUŞTURDUĞU HASAR ÜZERİNE  
MELATONİNİN KORUYUCU ETKİLERİ**

**Dr. CUMA MERTOĞLU**

**UZMANLIK TEZİ**

**TOKAT**  
**2013**



**T.C.**  
**GAZIOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK DOZ METİLPREDNİZOLONUN TAVŞAN KALP  
DOKUSUNDA OLUŞTURDUĞU HASAR ÜZERİNE  
MELATONİNİN KORUYUCU ETKİLERİ**

**Dr. CUMA MERTOĞLU**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Doç. Dr. HÜSEYİN ÖZYURT**

**TOKAT**

**2013**

## TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda büyük emeği geçen, eğitimim ve tez çalıőmam süresince bilgi ve deneyimleri ile beni destekleyen tez yöneticim Doç. Dr. Hüseyin ÖZYURT'a, tıbbi biyokimya anabilimdalı baőkanı Prof. Dr. őemsettin őAHİN'e, bölümümüz ğretim yeleri Yrd. Doç. Dr. Erkan SÖĞÜT'e ve Yrd. Doç. Dr. Ali AKBAő'a, anatomi anabilimdalı baőkanı Doç. Dr. Birsen ÖZYURT'a, anatomi anabilimdalı ğretim yesi Yrd. Doç. Dr. Ufuk TAő'a, birlikte çalıőtıđım asistan arkadaőlarıma ve tüm tıbbi biyokimya anabilimdalı çalıőanlarına,

Aileme ve arkadaőlarıma,

Teőekkürlerimi sunarım.

Dr. Cuma MERTOĞLU

## ÖZET

Glukokortikoidler günümüzde birçok hastalığın tedavisinde geniş terapötik etkinlikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Ancak ciddi yan etkileri de beraberinde getirmektedirler. Biz de bu çalışmamızda tek seferde uygulanan yüksek doz steroidin kalp dokusunda oksidan-antioksidan sistem üzerine etkilerini ve antioksidan özelliği bilinen melatonin hormonunun muhtemel koruyucu etkilerini araştırmayı amaçladık. Çalışmaya alınan tüm tavşanların kalp dokularından lipit peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyi, protein oksidasyon ürünü olan PC düzeyi ve NO düzeyi ölçüldü. Ayrıca, kalp dokularından antioksidan enzimler olan SOD, GSH-Px ve katalaz düzeyleri ölçüldü. Çalışmada 20 adet tavşan kullanıldı. Tavşanlar üç gruba ayrıldı. Grup I: Kontrol grubu olarak belirlendi ve 5 tavşan bulunduruldu. Grup II: metilprednizolon grubu olarak belirlendi ve 7 tavşan bulunduruldu, Grup III: metilprednizolon ve melatonin uygulanan gruptu ve 8 tavşan bulunduruldu. Çalışmanın sonuçları; deney yapılan tavşanlarda, MDA düzeyinin yalnız metilprednizolon grubunda arttığını ancak melatoninin grubunda azaldığını, PC düzeyinin metilprednizolon ve melatoninin grubunun her ikisinin de azaldığını, NO düzeyinin yalnız metilprednizolon grubunda değişmediğini melatoninin grubunda ise azaldığını göstermektedir. Metilprednizolon ve melatoninin tavşan kalp dokusu SOD enzim düzeyine etkisi görülmemiş, metilprednizolon ve melatoninin her ikisinin de GSH-Px ve katalaz düzeylerini artırdığı bulunmuştur. Bu sonuçlara göre metilprednizolon çalışma dozlarında, lipitler üzerine oksidan, proteinler üzerine ise antioksidan etkileri olduğunu, melatoninin güçlü bir antioksidan olduğunu söyleyebiliriz. Metilprednizolonun oksidan ve antioksidan olarak farklı etki dozlarının belirlenmesinde, etki mekanizmalarının anlaşılmasında ileri hayvan ve insan çalışmalarının yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Kalp, metilprednizolon, oksidatif stres, melatonin

## ABSTRACT

Glucocorticoids have been used in the treatment of a number of disease conditions due to their widely therapeutic effects. But they have serious side effects. We aimed that to investigate the effect of a single high dose steroid on the oxidant-antioxidant system of heart tissue and probably protective effects of melatonin that known antioxidant effects. Levels of MDA a lipid peroxidation product, PC a protein oxidation product and NO levels were measured from heart tissue samples all the rabbits included in the study. Also antioxidant enzymes that SOD, GSH-Px, catalase levels were measured from heart tissues. In the study 20 rabbits were used. The rabbits were separated into three groups. Group I: Control group and there were 5 rabbits, group II: Methylprednisolone group and there were 7 rabbits, Group III: Methylprednisolone and melatonin group and there were 8 rabbits. The results of the study showed that; MDA level increased in only methylprednisolone group but decreased in melatonin group, PC level decreased both methylprednisolone and melatonin groups, NO level didn't changed in only methylprednisolone group but decreased in melatonin group. According to this study, methylprednisolone and melatonin have no effect on SOD enzyme level in rabbit heart tissue. Both methylprednisolone and melatonin increased GSH-Px and catalase levels. According to the results of this study we can say that methylprednisolone have oxidant effects on lipids and antioxidant effects on proteins in study doses and melatonin is strong antioxidant. We believe that further animal and human studies are necessary to determine the different effect doses of methylprednisolone as an oxidant and antioxidant agent.

**Keywords:** Heart, methylprednisolone, oxidative stress, melatonin

## KISALTMALAR

ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
AOE	: Antioksidan enzim
AV	: Atriyo-ventriküler
BSA	: Bovine serum albumin
CAT	: Katalaz
CK	: Kreatin kinaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EKG	: Elektrokardiyografi
GC	: Glukokortikoid
GH	: Growth hormon
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSH-R	: Glutasyon redüktaz
GSSG	: Okside glutasyon
GST	: Glutasyon-S-Trasferaz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
HOMT	: Hidroksiindol-o-metiltransferaz
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İ-R	: İskemi-reperfüzyon
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LOO <sup>•</sup>	: Lipit peroksit radikalleri
LOOH <sup>•</sup>	: Lipit hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NAT	: N-asetiltransferaz
NBT	: Nitroblue tetrazoliumu
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NNDA	: N-naftiletilen diamin
NO	: Nitrik oksit
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Nitrit

$\text{NO}_3^-$	: Nitrat
NOS	: Nitrik oksit sentaz
$\text{O}^\cdot$	: Süperoksit radikali
$\text{O}_3$	: Ozon
OD	: Optik dansite
$\text{ONOO}^\cdot$	: Peroksinitrit
PC	: Protein karbonil
$\text{pO}_2$	: Parsiyel oksijen basıncı
PUFA	: Poliansatüre yağ asitleri
RNA	: Ribonükleik asit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SA	: Sino-atriyal
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiobarbitürik asit
TCA	: Triklorasetik asit

## ŞEKİLLER

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. Kalbin toraks boşluğu ve mediastinum medius içinde, her iki akciğer arasında, perikard ile sarılı olarak yerleşimi .....	4
2. Yapılan oblik kesi ile kalbin boşlukları .....	5
3. Kortikosteroidlerin biyosentezi .....	10
4. Melatoninin kimyasal yapısı .....	18
5. Serbest radikallerin zararlı etkileri .....	24
6. Malondialdehitin kimyasal yapısı .....	26



## TABLÖLAR

<b><u>Tablo</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
1. Tedavisi için glukokortikoid ilaç kullanılabilen endokrin olmayan hastalıklar .....	14
2. Sık karşılaşılan radikaller .....	22
3. Organizmada bulunan antioksidan sistem elemanları .....	28
4. Doku MDA Düzeyleri (Ort ± SS ) .....	40
5. Doku PC Düzeyleri (Ort ± SS ) .....	40
6. Doku NO Düzeyleri (Ort ± SS ) .....	41
7. Doku SOD Düzeyleri (Ort ± SS ) .....	42
8. Doku GSH-Px Düzeyleri (Ort ± SS ) .....	42
9. Doku Katalaz Düzeyleri (Ort ± SS ) .....	43

## GRAFİKLER

### Grafik

### Sayfa

1. Doku PC Düzeyleri .....41

## İÇİNDEKİLER

Sayfa	
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET	v
KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
GRAFİKLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	31
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ	54
7. KAYNAKLAR	55

## 1.GİRİŞ

Glukokortikoidler antiinflamatuvar ve immünsüpresif etkilerinden dolayı (1) otoimmün hastalıklar, lenfoproliferatif hastalıklar, alerjik hastalıklar gibi çok geniş bir yelpazede sıklıkla kullanılırlar. Ancak glukokortikoid fazlalığı nedeniyle oluşan ciddi yan etkiler kullanımlarını kısıtlar (2,3). Glukokortikoidlerin uzun süre yüksek düzeyde salınımı kronik stres durumunu gösterir ve kalp damar ve metabolik hastalıklara yatkınlığı artırırken (4,5), muhtemel yaşam süresini de kısaltır (6).

Glukokortikoidlerin uzun süre yüksek salınımının oksidatif strese çok açtığı öne sürülmüştür (7,8). Glukokortikoidlerin tiobarbitürikasit reaktanlarının seviyesini (9), ve doku antioksidan enzimlerinin seviyesini değiştirdiği bilinmektedir (10,11). Glukokortikoidlerin kalp, damar ve böbrek gibi değişik dokularda oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir (12-16). Glukokortikoidlerin neden olduğu damarsal hasarların ve hipertansiyonun antioksidan tedavi ile önlenmesi veya kısmen iyileştirilmesi glukokortikoidlerin istenmeyen yan etkilerine aracılık eden altta yatan mekanizmanın oksidatif stres olabileceğini desteklemektedir (15,16).

Melatonin yüksek antioksidan kapasiteye sahip bir hormondur (17). Epifiz bezinin baş sekresyon ürünü olan melatonin direkt radikal süpürücü özelliindedir ve indirek antioksidan özellik gösterir (18-21). Melatoninin yan etkilerinin az olması ve ucuz olması nedeniyle insanlarda kullanım potansiyeli yüksektir (22).

Direk serbest radikal giderici ve bir indirek antioksidan olarak antioksidan enzimleri stümüle eden melatoninin keşfi onun potansiyel kardiyoprotektif etkilerine ilgiyi artırmıştır (23). Kalp kan akımı tehlikeye girdiğinde melatoninin kalpte yararlı etkileri gösterilmiştir (24). Doksorubisin gibi kardiyotoksik ilaçların toksisitesini sınırladığı ve moleküler hasarı azalttığı gösterilmiştir (25-27). Oksidatif strese karşı faydalı etkileri karaciğer sirozu (28) ve akut pankreatitte (29) gösterilmiştir. Melatoninin ventriküler fonksiyonu üzerine faydalı bir etki olan antihipertansif özelliği gösterilmiştir (30).

Bu çalışmada metilprednizolonun kalp üzerine olan oksidan-antioksidan etkisi gösterilmeye çalışılacaktır. Literatürde metilprednizolonun etkilerinin araştırıldığı çalışmalar olmakla birlikte kalp üzerine olan çalışmalar oldukça azdır. Metilprednizolon uygulaması sonrası kalp dokusunda meydana gelen oksidatif stres

üzerine olan etkilerini ve melatoninin metilprednizolon ile beraber etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamızda yüksek doz metilprednizolon ve melatonin uygulanan tavşanlarda, kalp dokularındaki oksidan-antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

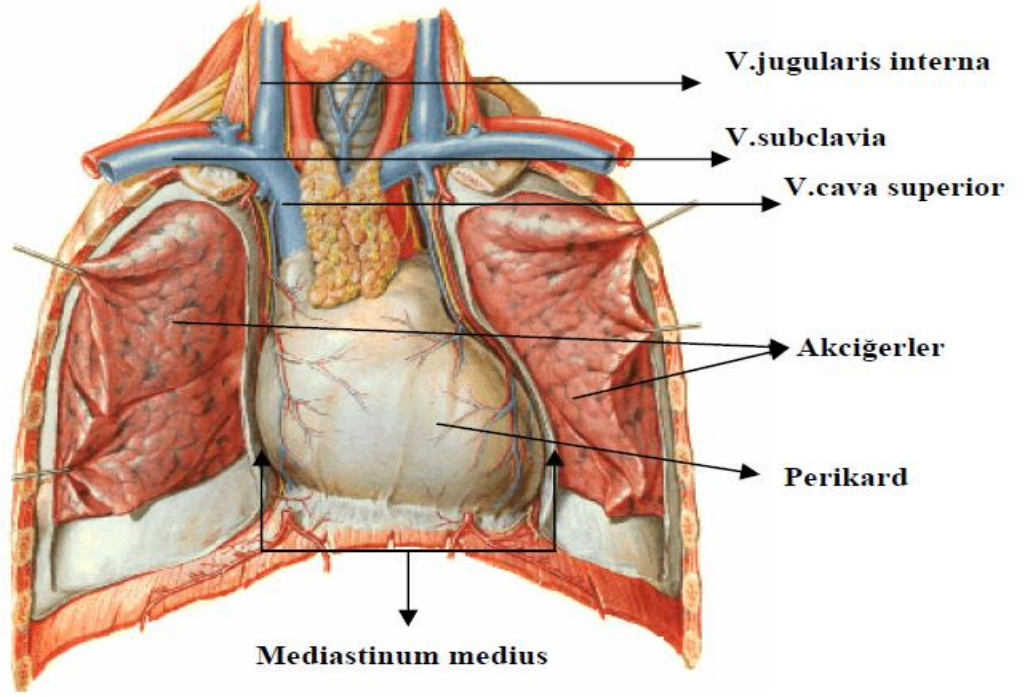
## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1. KALP**

#### **2.1.1. Anatomi**

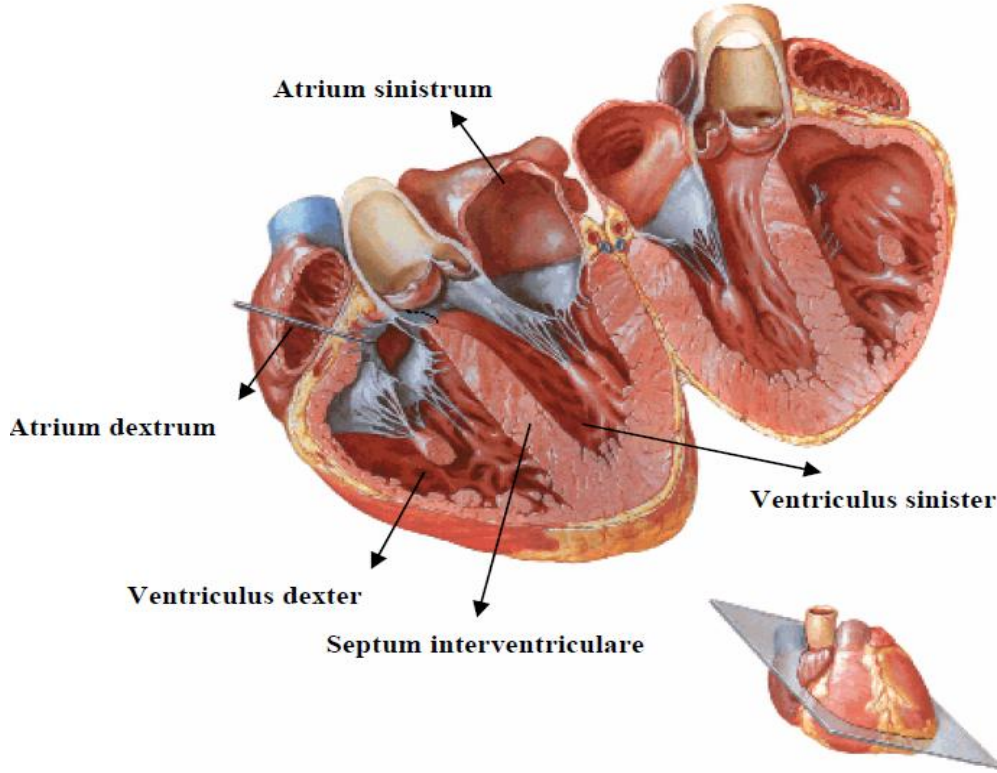
Dolaşım sisteminin merkezi organı olan kalp, perikardium diye adlandırılan özel bir zarla sarılı olarak, mediastinum mediusda, iki akciğer arasında yer almaktadır. Sternum ve kostaların arkasında oblik olarak yerleşmiştir. Ortalama bir insan kalbi tabanından tepesine kadar 12 cm olup, transvers çapı 8-9 cm'dir. Ortalama ağırlığı erkeklerde 300 gr kadınlarda 250 gr kadardır. Kalp ağırlığı vücut ağırlığı ile orantılı olup, vücut ağırlığının yaklaşık %0.40 ila %0.45 i kadardır (31,32).

Kalbin taban kısmı basis cordis, tepesi apex cordis diye adlandırılır. Basis cordis, sağa, arkaya ve biraz da yukarıya bakar. Apex cordis ise ön, sol tarafa doğrudur ve ventriculus sinister'e aittir. Kalbin ön tarafa bakan yüzüne facies sternokostalis adı verilir ve bu yüzü, atrium dextrum ve her iki ventrikül oluşturur. Aşağı ve arka tarafa bakan yüzüne facies diaphragmatica (facies inferior) denir ve bu yüzün büyük kısmı ventriculus sinister olmak üzere ventriküller tarafından oluşturulur. Kalbin akciğerlere temas eden yüzlerine ise facies pulmonalis dexter ve facies pulmonalis sinister adı verilir. Facies pulmonalis dexter sağ atrium, facies pulmonalis sinister ise daha çok ventriculus sinister olmak üzere atrium sinistrum ve auricula sinistra tarafından meydana getirilir. Kalbin üst kenarını atriumlar (büyük ölçüde atrium sinistrum), alt kenarını ise her iki ventrikül meydana getirir. Sol kenar, facies sternocostalis ile facies pulmonalis sinistra arasındadır ve ventriculus sinister ile auricula sinister tarafından meydana getirilir (31,32).



**Şekil 1.** Kalbin toraks boşluğu ve mediastinum medius içinde, her iki akciğer arasında, perikard ile sarılı olarak yerleşimi (33).

Septum interatriale, septum interventriculare ve septum atrioventriculare olarak adlandırılan septumlar ile kalp dört boşluğa ayırır. Bu boşluklar, atrium cordis dextrum, atrium cordis sinistrum, ventriculus dexter ve ventriculus sinister diye adlandırılır. Kalbin boşluklarını birbirinden ayıran septumlar dış yüzden de görülebilen oluklar oluşturur. Bu olukların bazıları oldukça derindir ve içerisinde bir takım oluşumları bulundurur. Atriumlar ile ventrikülleri birbirinden ayıran oluğa sulcus coronarius (sulcus atrioventricularis) denir. Sulcus coronarius, truncus pulmonalis'in bulunduğu yerde oluşmadığı için kalbi çepeçevre sarmaz. Bu olukta, kalbi besleyen ana koroner arterler ve sinus coronarius bulunur. Ventrikülleri ise önde ve arkada birer tane olmak üzere iki ayrı oluk birbirinden ayırır. Ön yüzde bulunan sulcus interventricularis anterior; arka yüzde bulunan ise sulcus interventricularis posterior'dur. Bu oluklar, apex cordis'in sağ tarafında, incisura apicis cordis olarak isimlendirilen bir çentikte birleşirler (31).



**Şekil 2.** Yapılan oblik kesi ile kalbin boşlukları (atrium dextrum, ventriculus dexter, atrium sinistrum, ventriculus sinister görülmektedir (33).

### 2.1.2. Kalbin Embriyolojisi ve Histolojisi

İlkel kalp ve damar sistemi embriyo’da üçüncü haftanın ortasında belirir ve kardiyovasküler sistem çalışmaya başlayan ilk sistemdir (34). Endokard tüpleri olarak adlandırılan bir çift vasküler yapı, splanknoplörük mezodermin kardiyojenik yörüngesinde embriyonik hayatın ondokuzuncu gününde gelişmeye başlar. İki adet olan vasküler yapılar, ince duvarlı endotel ya da endokard kalp tüplerini oluşturur. Bu iki endotel kalp tüpü üçüncü haftanın sonunda, toraks bölgesinde, orta çizgi boyunca bir araya gelir ve birleşerek tek bir primer endokard kalp tüpü oluşur. Uzayan kalp tüpünde yirmibirinci günde boğumlanmalar ve genişlemeler oluşur. Bunlar ventrikül, atrium, turuncus arteriosus, bulbus kordis, ve sinus venozus’tur (35,36).

Primer kalp tüpü başlangıçta endotelle döşelidir ve yirmiikinci günde kalın bir splanknoplörük mezoderm kitlesi ile sarılarak bundan iki yeni tabaka oluşur. Bu



tabakalar, miyokardium (kalp kası) ve bir matriks tabakasıdır (kardiak jel). Splanchnoplörük mezodermin bu örtü tabakası miyoepikard ya da epimiyokard örtüsü olarak adlandırılır. Çünkü bu örtü, miyokard ve kardiak jelle beraber aynı zamanda, kalp duvarının dış tabakası olan, seröz epikardı (visceral perikardium) da yapar. Epikardium, splanchnoplörük mezodermden bağımsız olarak meydana gelen ve sinus venosus ya da septum transversum'dan kalbin yüzeyine göç eden mezotel hücreleri tarafından oluşturulur. Kalp tüpünün iç yüzünü döşeyen endotel örtüsü, endokardium'u yapar (35,36) .

Embriyo'nun oksijen ve besleyici madde gereksinimi diffüzyon ile yeteri kadar karşılanması mümkün olmadığı için, kalp yirmiiki-yirmiüçüncü günlerde çalışmaya başlar. İlkel ventrikülün, iki ayrı ventriküle ayrılması, ventrikül tabanında kalbin apeksine yakın bir yerde, median musküler bir kabartıntı (septum interventriculare pars muscularis) oluşması ile meydana gelir (34).

Beşinci haftada, kalp bulbusu duvarındaki mezenşim hücrelerinin hızlı bir şekilde çoğalması bulbus kabartılarının oluşmasını sağlar. Buna benzer şekilde kabartılar truncus arteriosus'ta da meydana gelir ve bunlar bulbus kabartıları ile devam eder. Bulbus ve trunkus kabartıları, krista nöralis mezenşiminden köken alır. Krista nöralis hücreleri, ilkel yutak ve yutak yoluyla kabartılara doğru göç ederler. Aynı süreçte bulbus ve trunkus kabartılarında yüzseksen derece dönme meydana gelir. Bulbus ve trunkus katlantılarının bu şekilde dönmesi, ventrikülden akan kan nedeniyle olur. Kabartılar birleştiğinde burulmuş aorta ve koplmoner septum oluşur. Bu septum, kalp bulbus'u ve truncus arteriosus'u aorta ve truncus pulmonalis olmak üzere iki ana arter kanalına ayırır (34).

Kalp içten dışa doğru endokardium, miyokardium ve epikardium olarak adlandırılan üç tabakadan oluşur. Ayrıca perikardium denilen torba şeklindeki kalbe yapışık olmayan bir zarla da dıştan sarılmıştır (31).

*Endokardium:* Kalp boşluklarının iç yüzleri, kalp kapakçıkları, musculus papillaris, chorda tendinea, musculus pectinati ve trabecula carnea'ları örten ince bir zardır. Kan damarlarındaki intima tabakasının benzeridir.

*Miyokardium:* Kalp kası, birbiri içine girmiş oldukça karışık kas lifi bantlarından oluşur. Yapı olarak hem çizgili, hem de çizgisiz kas özelliğindedir.

Atrium ve ventrikülleri saran kaslar birbirinin devamı olmayıp aralarında kalp iskeleti bulunur ve böylece atrium ve ventriküller ayrı ayrı çalışabilirler.

*Epikardium:* Kalbin en dış tabakası olup, kalbi saran seröz torbanın(perikardium serosum) visseral yaprağından (lamina visceralis) olmak üzere iki kısımdır. Lamina visceralis, lamina parietalis ile devam eder. Yassı epitelyum hücrelerinden oluşan seröz perikard yaprakları, seröz bir sıvı salgırlar ve bu sıvı, kalbin çalışırken visseral ve parietal yaprakların birbirleri ile olan sürtünmelerini azaltır (31).

### **2.1.3. Kalbin Fizyolojisi**

Kalp, beyinden sonra en fazla oksijen ihtiyacı olan organdır. Kalbi besleyen damarlara arteria koronarius denir ve aortadan direkt çıkarlar. Kalp kası, içinde bulunan kandan doğrudan yararlanamaz. Koroner arterlerle gelen kan, vena kordis vasıtasıyla sağ atriuma dökülür. Kalbin pompaladığı tüm kanın %5-10' u kalp duvarının beslenmesi amacıyla kullanılır. Sağ koroner ve sol koroner olmak üzere iki adet olan koroner arterler aortanın başlangıcından çıkarlar (37).

Kalp kasını oluşturan kas tellerinin kollaterallerle ve birbirlerine bağlanmaları, diğer kas tellerinde bulunmayan üç boyutlu bir ağ sistemi oluşturur. Bunların birbirlerine bağlandıkları yerler, ışık mikroskopunda, Z bandlarından daha kalın diskler halinde görünürler ve interkalat diskler olarak adlandırılırlar. Bağlantı yerlerinden her biri, çoğunlukla, merdiven basamakları görünümünde olan birden çok disk içerirler. Bu bağlantı yerleri aynı zamanda uyarımlarında hücreden hücreye geçmelerini sağlarlar. Bağlantı yerlerine en belirgin olarak papiller kaslarda rastlanır (38).

Üst vena kava ile sağ atriyum arasında sino-atriyal (SA) düğüm bulunur. Atriyo-ventriküler (AV) düğüm ise, interatriyal septumun sağ arka bölümünde yer alır. AV düğümü, normal şartlarda atriyumlarla ventriküller arasındaki tek iletim yoludur. SA düğümünde başlayan depolarizasyon atriyumların içinde ışınal olarak dağılır, AV düğümünde tekrar biraraya gelirler. Atriyum depolarizasyonu yaklaşık 0.1 saniye(sn) içinde tamamlanır. AV düğümünde iletim yavaş olduğu için uyarı ventriküllere yayılmadan önce 0.1 sn süre geçer (AV düğüm gecikmesi). Septumun

tepesinden, depolarizasyon dalgası, hızlı iletim özelliği olan purkinje liflerinde dağılarak ventriküllerin her yerine 0.08-0.1 sn'de ulaşır (39).

## 2.2. GLUKOKORTİKÖİDLER

Böbrek üstü bezinde sentezlenen kortizol vb. hormonlar doğal glukokortikoidler (GC) olarak adlandırılırlar. Kısa süreli salınımlarda faydalı olan bu mekanizma uzun süreli ve yüksek miktarda salınımlarda başta kalp-damar sistemi olmak üzere bir çok sistemi olumsuz olarak etkilemekte ve istenmeyen durumlar ortaya çıkmaktadır (40).

İnsanlardaki endojen GC hormon kortizoldur (41,42). Kortizol salgısı, sabah erken saatlerde en yüksektir ve gün içinde gittikçe azalarak akşamları en düşük düzeyine ulaşır. Gün içi değişiklik göstermesine rağmen adrenal korteksten sürekli olarak salınır fakat salınım ve etkileri çevresel stres faktörlerine bağlı olarak değişkenlik arzeder (41).

### 2.2.1. Glukokortikoidlerin Sentezi

Kortizol ve doğal glukokortikoidler adrenal korteksin zona fasciculata ve zona retikularis tabakalarında, sentezlenirler. Adrenal steroidlerin temel yapısı 17 karbon atomu bulunduran siklopentanoperhidrofenantren halkasıdır. Sitokrom p-450 türü çeşitli karma fonksiyonlu oksidazlar sentezde görev alır.

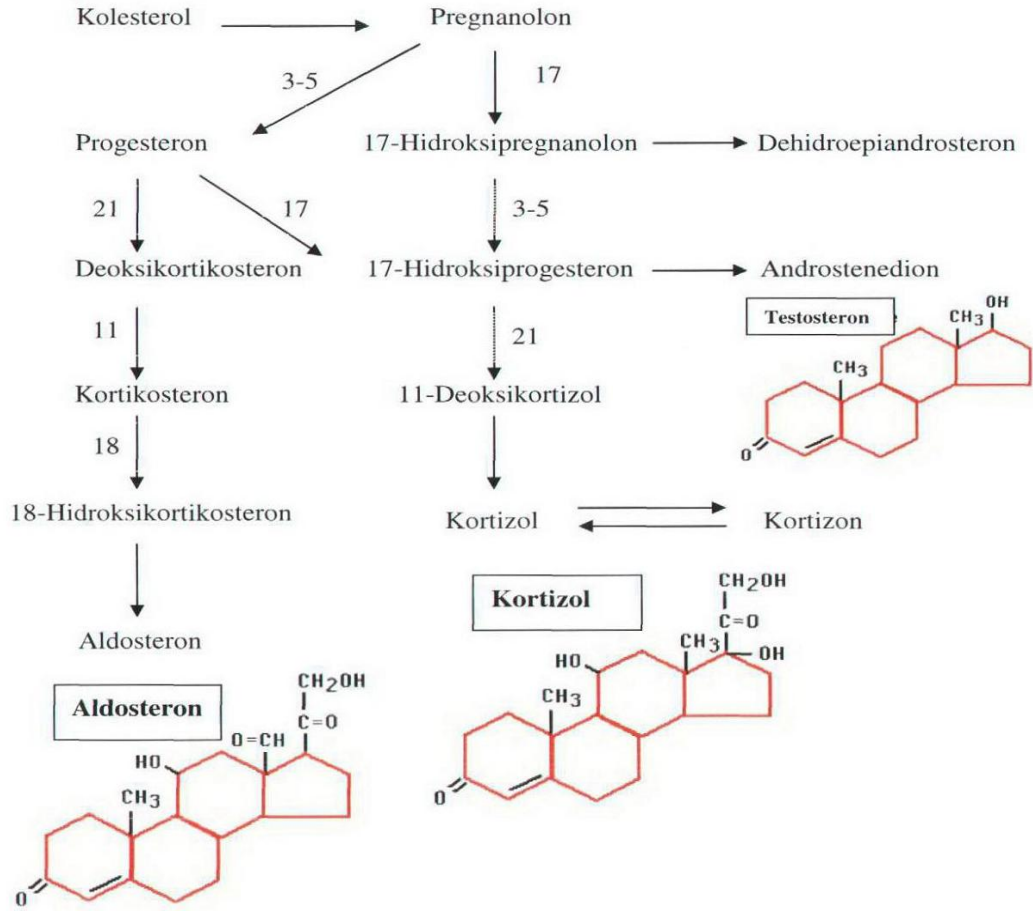
**1. Serbest kolesterol sentezi:** Adrenal korteksde kortikosteroid sentezinde temel olarak ekzojen kolesterol kullanılır. Kolesterolün kaynağı olarak düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptör aracılı endositoz işlemi ile dışardan alınır. Kolesterolün % 20-40'ı ise asetattan hücre içinde sentezlenir. Kolesterol hücrede kolesterol esteri şeklindedir. Önce kolesterol esteraz enzimi ile serbest kolesterol haline getirilir. Sonra serbest kolesterol pregnonolona dönüştürülmek üzere mitokondrielerin dış membranından iç membranına transfer edilir. ACTH esas olarak kolesterol esteraz aktivitesini artırarak sentezi artırır (43).

Mitokondri iç matriksinde yerleşmiş olan, kolesterol yan zincirini koparan (side chain cleavage) enzim (p450sc) tarafından kolesterolün yan zinciri koparılarak pregnanolon elde edilir. Diğer aşamalar ise endoplazmik retikulum ve mikrozomlarda olur (44,45).

**2. İzomerizasyon ve dehidrojenasyon:** Pregnonolonda C-5 ve C- 6 arasında çift bağın C-5 ve C-4 arasında kaydırılmasıyla izomerizasyon olur. Ayrıca 3-beta

hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi ile C-3 grubundaki hidroksil keton grubuna dönüştürülürken ara ürün olarak progesteron oluşur (44,46).

**3.Hidroksillenme:** Sırasıyla C-17, C-21 ve C-11 karbonları hidroksillenir. Bu reaksiyonlarda 17 alfa-hidroksilaz, 11 beta-hidroksilaz enzimleri görev alır. Şekil 3’de kortikosteroidlerin biyosentezi gösterilmektedir (44,46,47).



3: 3 $\beta$ -Hidroksidehidrojenaz; 5:  $\Delta$ 5-izomeraz; 11: 11 $\beta$ -Hidroksilaz; 17: 17 $\alpha$ -Hidroksilaz; 21: 21-Hidroksilaz; 18: 18-Hidroksilaz.

**Şekil 3.** Kortikosteroidlerin biyosentezi (48).

### 2.2.2. Kortikosteroidlerin Fizyolojik Etkileri

Kortikosteroidlerin etkileri çok fazla ve çok çeşitlidir. Bunlar; karbohidrat, protein ve yağ metabolizmasında değişik etkiler meydana getirmek, sıvı ve elektrolit

dengesinin sağlanması, kardiyovasküler, immün, böbrek, iskelet kası, endokrin ve sinir sisteminin normal işlevinin sürdürülmesine katkı sağlamak.

*Karbonhidrat ve protein metabolizmasına etkileri:* GC'in çok çeşitli metabolik etkiler gösterirler karaciğerde glukoneogenezi stümüle ederler, periferel dokularda glukoz alımını durdururlar ve insülini baskırlar (49,50).

Glukokortikoidler karaciğer dışında diğer tüm dokularda protein sentezini inhibe ederek antianabolik etki gösterirken çizgili kaslar ve bağ dokusu başta olmak üzere çeşitli dokularda protein yıkımını artırarak da katabolik etki gösterirler. Karaciğere aminoasit transferini artırarak glukozla dönüşüm ve glikojen yapımı artarken diğer yandan üre ve amonyak oluşumu, idrar ile azot kaybı artar ve sonuçta azot dengesi negatifleşir. Kortizol fazlalığı durumunda kaslarda protein kaybı, zayıflık ve atrofiye neden olur (43,44,46). Ciddi katabolik bir durumda, artan insülin direncinden dolayı (51) veya glukokortikoidlerin direk proteolitik etkilerinden (52) dolayı glukokortikoidlerin indüklediği diyabet gelişimiyle sonuçlanabilir.

*Lipid metabolizması üzerine olan etkileri:* Cushing sendromunda olduğu gibi vücut yağların dağılımını değiştirir ve adipozitetlerde lipoliz oluşturur ve serbest yağ asitlerini artırır. Glukokortikoidlerin, aşırı salgılanmaları veya ilaç olarak yüksek dozda kullanılmaları durumunda insülin düzeyini yükseltmeleri ve iştahı artırmaları nedeniyle lipojenik etki de yaparlar. Lipolitik ve lipojenik etkiler sonucu yağın vücutta dağılımı değişir ve Cushing sendromu gibi durumlarda yağ ensede ve supraklaviküler bölgede birikerek 'bufalo hörgücü' denilen görüntü oluşur. Gövdede ve yüzde cilt altı yağ dokusu artar. Ancak ekstremitelerde cilt altı yağ dokusunu ve kasları eritirler (43,44,46,53).

### **2.2.3. Farmakokinetik Özellikleri**

Kortikosteroid hormonlar ve ilaçlar, hücre membranını difüzyonla geçerek hedef hücrelerde sitoplazma ve çekirdek içinde kendilerine özgü reseptör proteini ile birleşerek etkilerini gösterirler (48). Kortikosteroidler antiinflamatuvar etkilerini, hücre içi reseptörleri aracılığı ile prostaglandin sentezini etkileyerek ve nükleer faktör Kappa B'yi (NF-κB) aktive ederek gösterirler (54,55). Glukokortikoidler inflamasyon bölgesinde plazma eksudasyonunu ve lökosit birikimini şiddetli bir şekilde inhibe ederler. Uygulama dozu, uygulama yolu, hedef hücre gibi birçok

faktör bu etkinin derecesini etkiler. Glukokortikoidler makrofaj farklılaşmasını antagone eder, nötrofillerin endotel hücrelerine yapışmasını engeller, dolaşımdaki eozinofil ve bazofil sayısını ve alerjik reaksiyonda eozinofil ve mast hücre birikimini azaltırlar. Endotelyal hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyerek vasküler geçirgenliği belirgin bir şekilde azaltırlar. Proliferasyonun ve büyüme faktörünün indüklediği DNA, protein ve kollajen sentezini baskılar. Fosfolipaz A2 aktivitesini azaltarak prostaglandin sentezini inhibe ederler. Glukokortikoidler, ayrıca T ve B lenfosit aktivitesini inhibe ederek immün sistemi baskılar (56-58).

Sentetik glukortikoidler ağız yoluyla alındıklarında gastrointestinal sistemden tam olarak emilirler. Suda çözünen esterleri intravenöz uygulamadan sonra hızlı bir şekilde yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Lokal uygulamalarda da bazen sistemik emilim görülebilir. Ağızdan alındıktan 2-8 saat sonra maksimum plazma düzeylerine ulaşırlar. Plazma yarılanma ömürleri 90 ila 180 dakika kadardır. Ağız yolundan kullanıldığında genellikle günde iki kez verilirler. Günlük dozun üçte ikisinin sabah, kalan dozun da öğleden sonra veya akşam alınması önerilir. Bunun nedeni ise; birincisi sabah erken saatlerde ACTH salgılanma hızının yüksek olması sebebiyle ACTH salgılanmasındaki istenmeyen baskılanmanın daha az olmasıdır, ikincisi ise plazma glukortikoid düzeyindeki doğal gün içi ritmi taklit eden ilaç plazma profilini oluşturma amaçlıdır. Günlük doz sabah bir defada da verilebilir. Gün aşırı uygulamalarda ise iki günlük doz sabahları bir defada da verilebilir (48,59).

#### **2.2.4. Glukokortikoidlerin Kullanım Alanları**

Glukokortikoidler antiinflamatuvar ve immünsüpresif etkilerinden dolayı (1) otoimmün hastalıklar, lenfoproliferatif hastalıklar, alerjik hastalıklar gibi çok geniş bir yelpazede sıklıkla kullanılırlar. Ancak glukokortikoid fazlalığı nedeniyle oluşan ciddi yan etkiler kullanımlarını kısıtlar. Kullanıldıkları hastalıklarda güçlü terapötik etkinlik gösterirler. Bu nedenle, kısa zamanda hastasında yüz güldürücü sonuç almak isteyen bazı hekimler tarafından kolayca suistimal edilebilirler; fakat yan etkileri fazla ve ciddi nitelikte olan ilaçlardır. İlaçların genellikle iki kenarı keskin bir kılıç olduğu söylenir, bu söylemi glukokortikoidler için iki kenarı çok keskin kılıç olarak değiştirmek hatalı olmaz (48).

Kullanım alanlarını başlıca üç grupta toplayabiliriz:

1) Adrenal fonksiyon bozukluklarında kullanılışları (replasman tedavisi):

Akut adrenal yetmezlik, kronik adrenal yetmezlik (Addison hastalığı), sekonder ve tersiyer adrenal yetmezlik, konjenital adrenal hiperplazi sendromları.

2) Endokrin nitelikte olmayan durumlarda kullanılışları:

Bu durumlarda genellikle antiinflamatuvar, antiallerjik, immünsupresif etkileri ve hematopoetik sistem üzerine etkileri nedeniyle kullanılırlar. Mineralokortikoid etkisi çok az olan veya hemen hemen hiç bulunmayan sentetik glukokortikoidler tercih edilir. Glukokortikoidler endokrin olmayan hastalıklardaki kullanım alanları tablo 1'de verilmiştir. Glukokortikoidler bu hastalıkların bir kısmında ilk tercih edilecek ilaçlar değillerdir. Diğer ilaçlara yanıt alınamayan durumlarda kullanılırlar (48).



**Tablo 1:** Tedavisi için glukokortikoid ilaç kullanılabilen endokrin olmayan hastalıklar

<b>Artritler</b> Romatoid artrit Psöriyatik artritler Gut artrit Bursit ve tenosinovit Ankilozan spondilit	<b>Cilt hastalıkları</b> Ekzema Seboreik dermatit Temas dermatiti İntertrigo Liken planus Eritema multiforme Alopesia areata Pemfigus Eksfoliyatif dermatit
<b>Alerjik hastalıklar</b> Astım Ürtiker ve anjioödem Atopik dermatit Alerjik rinit Alerjik konjonktivit	<b>Hematolojik ve onkolojik</b> İmmün trombositopenik purpura Lenfoma Lösemi Aplastik anemi Otoimmün hemolitik anemi
<b>Kollojen doku hastalıkları ve vaskülitler</b> Sistemik lupus eritematozus Poliarteritis nodoza Polimiyozit Dermatomiyozit Miks kolojen doku hastalıkları Henoch schönlein purpurası	<b>İnflamatuvar barsak hastalıkları</b> Crohn hastalığı Ülseratif kolit
	<b>SSS hastalıklar</b> Kafa içi basınç artımı Beyin ödemi Tüberküloz menenjit
<b>Böbrek hastalıkları</b> Nefrotik sendrom Sistemik hastalıklara bağlı gelişen glomerülopatiler	<b>Diğer</b> Sarkoidoz Hiperkalsemi Bell paralizi Şok Otoimmün hepatit
<b>Kardiyak nedenler</b> Akut romatizmal ateş, kardiyomiyopati	

3)Endokrin hastalıklarda tanı amaçlı kullanımları.

### 2.2.5. Yüksek Doz Kortikosteroid Uygulaması

Pulse steroid tedavisi hızlı antiinflamatuvar ve immünsüpresif etki sağlamak için yüksek doz steroidlerin kısa süreli infüzyonlar halinde uygulanması yöntemidir.

Bu tedavi ilk kez böbrek transplant rejeksiyon reaksiyonlarını önlemek ve tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır (60). Pulse steroid tedavisinde genellikle antiinflamatuvar ve immünsupresif etkisi yüksek, hipotalomo-hipofizer adrenal aksı baskılama özelliği ve mineralokortikoid etkisi az, eliminasyonu hızlı, yarı ömrü kısa olan glukokortikoid türleri tercih edilir. Metilprednizolon; eliminasyon yarı ömrünün kısa olması, farmakokinetik özelliklerinin dozla beraber değişmemesi nedeniyle pulse uygulamada sık kullanılmaktadır (61).

#### **2.2.6. Yan Etkiler ve Kontrendikasyonlar**

Glukokortikoidler; aydede yüzü görünümü, trunkal obezite, stria oluşumu, hirsutizm, katarakt, osteoporoz, miyopati, diyabetes mellitüs, immünsüpresyon, hipertansiyon ve ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıklar başlıcaları olmak üzere geniş bir yan etki spektrumuna sahiptirler. Bunlar arasında kardiyovasküler komplikasyonlar glukokortikoid fazlalığının mortalite ve morbiditesini tahmin etmede önemli bir faktördür (62).

Sistemik enfeksiyonlarda, fungal sepsislerde, kontrol altında olmayan hipertansiyonu olanlarda, steroide karşı hipersensivitesi olanlarda steroidler kontrendikedir.

#### **2.2.7. Yüksek doz steroid tedavisi sırasında görülen kardiyovasküler yan etkiler**

Glukokortikoidlerin uzun süre yüksek düzeyde salınımı kronik stres durumunu gösterir ve kalp damar ve metabolik hastalıklara yatkınlığı artırırken (4,5) muhtemel yaşam süresini de kısaltır (6).

Romatoid artrit, otoimmün hastalıklar, organ transplantasyonu ve diğer endikasyonlarda glukokortikoidlerin uzun süreli kullanılması hafif, bazen de ciddi tansiyon yüksekliğine neden olur. Benzer şekilde cushing sendromlu hastalarda da sistemik hipertansiyon görülür (3). Glukokortikoidlerin neden olduğu hipertansiyon mineralokortikoidlerin ve sodyum retansiyonunun etkisinden bağımsızdır çünkü bir mineralokortikoid reseptör antagonisti olan spironolakton glukokortikoidlerin neden olduğu hipertansiyonu engellemede etkisizdir (63-65). Hipertansiyona bağlı olarak beyin içi kanama, strok, hipertansif ensefalopati gibi komplikasyonlar ortaya

çıkabilir. Hipertansiyon ve hiperlipidemi nedeniyle ateroskleroz oluşmasını hızlandırabilirler (66,67).

Deksametazon uygulaması kalp hipertrofiyle sonuçlanabilir (68). CK, LDH, ve CKMB gibi enzimlerin çalışmasını artırması deksametazonun indüklediği kalp hipertrofisinin varlığının ya da ciddiyetinin değerlendirilmesinde yardımcı olabilir. Kalpte total CK ve LDH artışı görece olarak glikolitik ve oksidatif kapasitede değişikliği yansıtır, miyokardial oksijen tüketimini etkiler, miyokardın kuvvetini değiştirir (69).

Kortikosteroidler damar düz kasının ve miyokardın adrenerjik sinir uyarımına verdiği yanıtı ve damarların vazokonstriktör hormonlara duyarlılığını artırarak kalp debisini ve damar tonusunu etkilerler. Endotoksik şokta kortikosteroid tedavisi; özellikle küçük venlerde oluşan ve organlara kan akışını engelleyen spastik oklüzyonun ve şokta salınan vazoaaktif maddeler aracılığı ile oluşan vazokonstriksiyonun ortadan kalkmasına destek olur. Miyokardın beta reseptör uyarımı ile oluşan aritmogenik etkilere duyarlılığını artmasına neden olurlar. Cushing'li hastalarda atrioventriküler iletenin, sempatik deşarjın ve atrioventriküler nodun aktivasyonunun arttığı bildirilmiştir (70).

Yapılan çalışmalarda glukokortikoid uygulaması sonrası; kalp hızında istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme (71), EKG'de PR mesafesinde kısalma ve bradikardi (72), QRS komplekslerinde genişleme, tam AV blok, idioventriküler ritim (73), ani ölümler (74), ortalama kan basıncı ve sistemik vasküler direnç düşüklüğü, kalp hızında artma (75) saptanmıştır.

### **2.2.8. Glukokortikoidler ve oksidan-antioksidan sistem**

Glukokortikoidlerin fizyolojik fonksiyonları geleneksel olarak; karbonhidrat, protein, lipid ve immünsüpresif aktiviteyi kontrol ederek organizmanın strese karşı direncini artırmak olarak bilinir. Ancak glukokortikoidlerin yüksek dozlarda antiinflamatuvar ve antialerjik savunma mekanizmasını baskıladığı görülmüştür. Yüksek doz glukokortikoidlerin bu yıkıcı etkilerinin muhtemel sonuçları hücre ölümü ve hücre eliminasyonudur (76,77).

Ancak glukokortikoidlerin indüklediği hücre ölümünün mekanizması tam bilinmiyor. Bazı yayınlar glukokortikoidlerin reaktif oksijen türlerinin açığa

çıkmasına aracılık etmesi ile kalsiyum artışına ve hücre sel yapıda bozulmanın eşlik ettiğini bildirmektedir (78,79). Deksmetazonun apoptozis veya hücre ölümünü indüklemesi glukokortikoid hormon reseptörü aracılığıyla olur, GHR antagonistleri glukokortikoidlerin bu etkisini engeller (80,81). Deksmetazon uygulanan lenfoblastik hücre kültürlerinde reaktif oksijen türleri aktivitesi artmış, SOD aktivitesi ve GSH redoks döngüsü azalmış ve programlı hücre ölümü (apoptozis) hızlanmıştır (79,82). Glukokortikoidlerin lenfoblastik hücreler ve eozinofiller için apoptotik olduğu biliniyor (83). Reaktif oksijen türleri bir tür hücre eliminasyonuna eşlik ederler (84).

Ancak glukokortikoidler düşük dozda nötröfiller ve diğer bazı hücre tipleri için kültürde yaşamsal faktörler gibi davranır (76). Bu nedenle glukokortikoidlerin etkisiyle reaktif oksijen türlerinin indüklediği hücre ölümü artışı hücre tipine ve doza bağlıdır. Glukokortikoidlerin TBA reaktanlarının seviyesini (9), doku antioksidan enzimlerinin seviyesini değiştirdiği bilinmektedir (10,11). Glukokortikoidlerin kalp, damar ve böbrek gibi değişik dokularda oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir (12-16). Glukokortikoidlerin uzun süre yüksek salınımının oksidatif strese çol açtığı öne sürülmüştür (7,8).

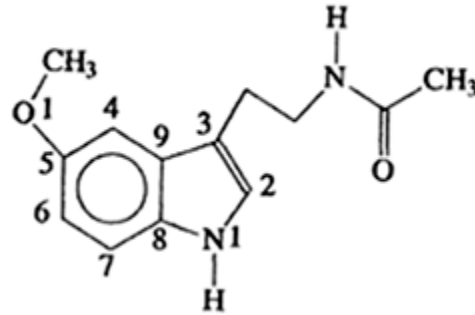
Beyinle alakalı olarak, glukokortikoidler reaktif oksijen türlerinin varlığını hipokampal ve kortikal kültürde artırmış (85) ve bazal beyin antioksidan enzimlerinin aktivitesini azaltmıştır (86). İnvitro çalışmalar göstermiştir ki; glukokortikoid maruziyeti beyincik granüllü hücrelerde ve hipokampal nöronlarda oksidatif stresin indüklediği hücre ölümüne duyarlılığı artırmaktadır (87,88).

Glukokortikoidlerin neden olduğu damarsal hasarların ve hipertansiyonun antioksidan tedavi ile önlenmesi veya kısmen iyileştirilmesi glukokortikoidlerin istenmeyen yan etkilerine aracılık eden altta yatan mekanizmanın oksidatif stres olabileceğini desteklemektedir (15,16).

### 2.3. MELATONİN

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) ciddi antioksidan özellikleri olan bir moleküldür (89) (Şekil 4). Kandaki melatoninin başlıca kaynağı pineal bezdir ve bazı sınırlı durumlarda gastrointestinal sistemden de salgılanır (90,91). Pineal bezin yanısıra retinanın fotoreseptör hücreleri ve bağırsağın enterokromafin hücreleri gibi diğer bazı hücreler de melatonin sentezleme yeteneğine sahiptirler (92). Bu hücrelerde ve komşu bölgelerinde melatonin konsantrasyonu kandan daha yüksektir. Tam olarak hangi hücrelerin melatonin sentezleme yeteneği olduğu net olarak bilinmiyor ancak çok fazla sayıda hücrenin melatonin salgıladığı bilinmektedir (93). Bu hücreler melatonin ürettiğinde ya kendiler kullanabilirler ya da otokrin salgıyla yakın hücrelere ya da parakrin salgıyla uzak dokulara sekrete edebilirler (94).

Melatonin pineal bez dışında üretilse de, pineal bezden sekrete edilen melatoninin serbest radikallerden koruduğu gösterilmiştir. Cerrahi olarak pinealektomi yapıldığı zaman, yüksek miktar serbest radikallere bağlı oluşan moleküler hasarın arttığı gösterilmiştir (27,95,96).



Şekil 4: Melatoninin kimyasal yapısı (89).

Melatonin, esansiyel bir aminoasit olan triptofandan sentezlenir. Triptofan, triptofan hidroksilaz enzimi ile pinealositlerde 5-hidroksitriptofana hidroksillenir. 5-hidroksitriptofan, aromatik-L-aminoasit dekarboksilaz ile 5-hidroksitriptamine (serotonin) dekarboksillenir. Serotonin, N-asetil transferaz (NAT) enzimi ile N-asetil serotonine ve bu da, hidroksiindol-o-metil transferaz (HOMT) etkisi ile melatonine (N-asetil-5-metoksitriptamin) dönüşür. Serotonin melatonin dönüşümünü sağlayan NAT ve HOMT aktivitelerinin geceleri daha yüksektir (97).

İnsanlarda melatoninin karanlığın ilk saatlerinde sekresyonu başlar ve gece yarısı pik yapar. Melatonin hidroksilasyonla (6-hidroksimelatonin'e) karaciğerde

hızlı bir şekilde metabolize olur (98). Melatoninin ikinci ve üçüncü kuşak metabolitleri de radikal temizleme, gen ekspresyonunu uyarma ve antioksidan enzimleri aktive etme yeteneğine sahiptirler (20,21).

Melatonin ilk önce gece gündüz farkı oluşan yolculuklarda meydana gelen jetlag tedavisinde kullanılmış, sonra bir uyku düzenleyici ajan olarak yaygınlaşmıştır (99,100). Deneysel ve klinik çalışmalarda bazı kanser tiplerinin büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (101,102). Melatoninin; sirkadiyen ve mevsimsel ritim, retinal fizyoloji, immün ve üreme fonksiyonları üzerine de etkileri vardır (103-105).

Koroner kalp hastalığı olan bireylerde normal bireylere göre melatonin seviyesi düşük bulunmuştur (106). Ani kardiyak ölüm insidansı sabah saatlerinde yüksek iken bu saatlerde melatonin seviyesi anlamlı bir şekilde düşüktür (107). Yaşlanma ile kalp hastalıkları insidansı artarken melatonin seviyesi azalmaktadır (108). Tüm bunlar melatoninin kalp hastalıklarının patofizyolojisinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Melatonin yenidoğan bebeklerde gram negatif bakteriyel enfeksiyonlarda ve respiratuvar distres sendromunda diğer ilaçların yanında kullanılmıştır. Bu iki ciddi hastalık durumunda fazla miktarda üretilen toksik serbest radikaller ve doku hasarı ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır (109-112).

### **2.3.1. Melatoninin Antioksidan Etkileri**

Melatonin büyük antioksidan kapasiteye sahip bir hormondur (17). Epifiz bezinin baş sekresyon ürünü olan melatonin direkt radikal süpürücü özelliindedir ve indirek antioksidan özellik gösteririr(18-21). Yan etkilerinin az olması ve ucuz olması nedeniyle insanlarda kullanım potansiyeli yüksektir (22).

Çok fazla toksik etkileri olan OH ile etkileşir ve hidrojen peroksiti, peroksinitrit anyonunu, NO'i ve hipokloröz asidi nötralize eder. Süperoksit dismutaz (SOD), GSH, CAT, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan sistem enzimlerinin sentezini artırır (113,114). Melatonin hücre içi önemli bir antioksidan olan glutatyon (GSH) sentezini uyarır (115). Nitrik oksit (NO) sentezini ise inhibe eder. Melatonin bir yandan antioksidan enzimlerin etkinliklerini artırırken diğer yandan antioksidan enzimleri oksidatif stresten de korur. Mitokondrideki elektron transport zincirinden elektron sızıntısını önler ve serbest

radikal üretimini azaltır. Melatonin hücre membranını oksidatif durumlara karşı daha dayanıklı hale getirirken nükleer DNA'yı da oksidatif hasardan korur (89,116,117).

Diğer antioksidanlar elektron donörü olarak redoks siklusuna girmekte ve oksidasyonu önlerken, artırma ihtimali de olabilmekte iken melatonin; üriner sistemle atılabilen çok sayıda metabolit oluşturarak, oksidantlarla savaşmakta ve redoks siklusuna girmemektedir. Böylece oksidasyona sebebiyet vermemekte ve bu özelliklerinden dolayı diğer antioksidanlardan farklı olarak terminal antioksidan olarak adlandırılmaktadır. Vitamin E, vitamin C ve  $\beta$ -Karoten gibi güçlü antioksidanlarla beraber sinerjik etkiye sahiptir (118,119). Melatonin invitro koşullarda ve özellikle invivo koşullarda yüksek radikal üretiminin olduğu koşullarda moleküler hasarı azaltmada vitamin E ve vitamin C'den daha etkili bulunmuştur (120-123).

Direk serbest radikal giderici ve bir indirek antioksidan olarak antioksidan enzimleri stümüle eden melatoninin keşfi onun potansiyel kardiyoprotektif etkilerine ilgiyi artırmıştır (23). Kalp kan akımı tehlikeye girdiğinde melatoninin kalpte yararlı etkileri gösterilmiştir (24). Doksorubisin gibi kardiyotoksik ilaçların toksisitesini sınırladığı ve moleküler hasarı azalttığı gösterilmiştir (25-27). Oksidatif strese karşı faydalı etkileri karaciğer sirozu (28) ve akut pankratitte (29) gösterilmiştir. Melatoninin ventriküler üzerine faydalı bir etkisi olan antihipertansif özelliği gösterilmiştir (124).

Melatoninin, birçok farklı doku iskemi/reperfüzyon (İ/R) modellerinde serbest radikal süpürücü etkiye sahip olduğu, gösterilmiştir (126,127). Serbest radikallerin önemli bir kaynağı olan mitokondri serumdan daha fazla melatonin içerir (128).

Melatonin; oral uygulanım, hem yağda çözünen hem de suda çözünen ortamlarda mükemmel doku dağılımı ve hücrenin her bölümünde, özellikle miyokardial hücreler için çok önemli olan mitokondride yüksek birikme kapasitesi gibi bir çok farmakolojik avantajlara sahiptir (23).

## **2.4. SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ**

Reaktif oksijen türleri (ROT) fizyolojik koşullarda kontrollü bir oranda sürekli olarak oluşturulmaktadır. Fakat ksenobiyotikler, kirleticiler iyonize radyasyon, ultraviyole ışık gibi nedenlerle oluşan oksidatif stres durumlarında oluşumları dramatik bir şekilde artar (129).

Reaktif oksijen türleri (ROT), dolaşım bozukluğuyla ilişkili kardiyovasküler hastalıklar (130), primer glomerulopati (131), karaciğer hastalıkları gibi (132) değişik hastalıkların patogenezinde kritik role sahiptir.

En dış yörüngede ortaklanmamış bir veya daha fazla elektrona sahip olan atom veya moleküller serbest radikaller olarak bilinir (133). Serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemindeki nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gereklidir ancak endojen serbest radikallerin fazla üretimi oksidatif strese yol açarak doku hasarına ve hücre ölümüne neden olur. Başlıca radikal türleri Tablo 2’de gösterilmektedir (134).



**Tablo 2:** Sık Karşılaşılan Radikaller

Radikal	Simge	Tanımlama
Hidrojen	H <sup>•</sup>	Bilinen en basit radikal
Süperoksit	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil	OH <sup>•</sup>	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti
Hidrojen peroksit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Yarılanma ömrü hızlı, güçlü oksidatif oksijen formu
Perhidroksi radikal	HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Lipitlerde hızlı çözünerek lipit peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikal	ROO <sup>•</sup>	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipitlere lokalize olur
Triklorometil	CCl <sub>3</sub>	CCl <sub>4</sub> metabolizması ürünü karaciğerde üretilen bir radikal
Tiyonil radikali	RS <sup>•</sup>	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil	RO <sup>•</sup>	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Nitrojen oksit	NO	L- arjinin aminoasidinden in- vivo üretilir
Nitrojen dioksit	NO <sub>2</sub>	NO <sup>•</sup> in oksijen ile reaksiyonundan üretilir

*Serbest radikaller üç temel yolla oluşur:*

1. Isı, radyasyon ve elektromanyetik dalgalar ile kovalent bağların kırılması sonucu,

2. Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sonrası dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalması sonucu,

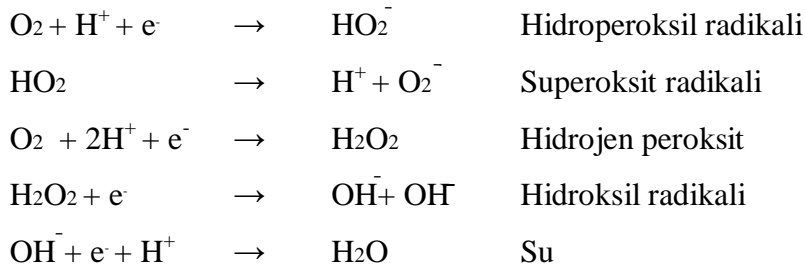
3. Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron bulunduyorsa, bu tür bir indirgenme reaksiyonu radikal oluşumuna sebep olabilir (135).

Mitokondrial ve mikrozomal elektron transport zinciri, oksidan enzimler, otooksidasyon, prostoglandin yolađı endojen olarak serbest radikallerin oluřumuna yol ačan metabolik yollara örnektir (136,137).

Kullanılan birçok ilaç, özellikle antineoplastik ajanlar ve antibiyotikler serbest radikal oluşumuna neden olabilirler. Bu ilaçların kemoterapötik ve sitotoksik etkilerinin pek çoğu oksijeni superoksit radikaline, hidrojen peroksit ve hidroksil radikaline indirgeme özelliğine bağlanmaktadır (138).

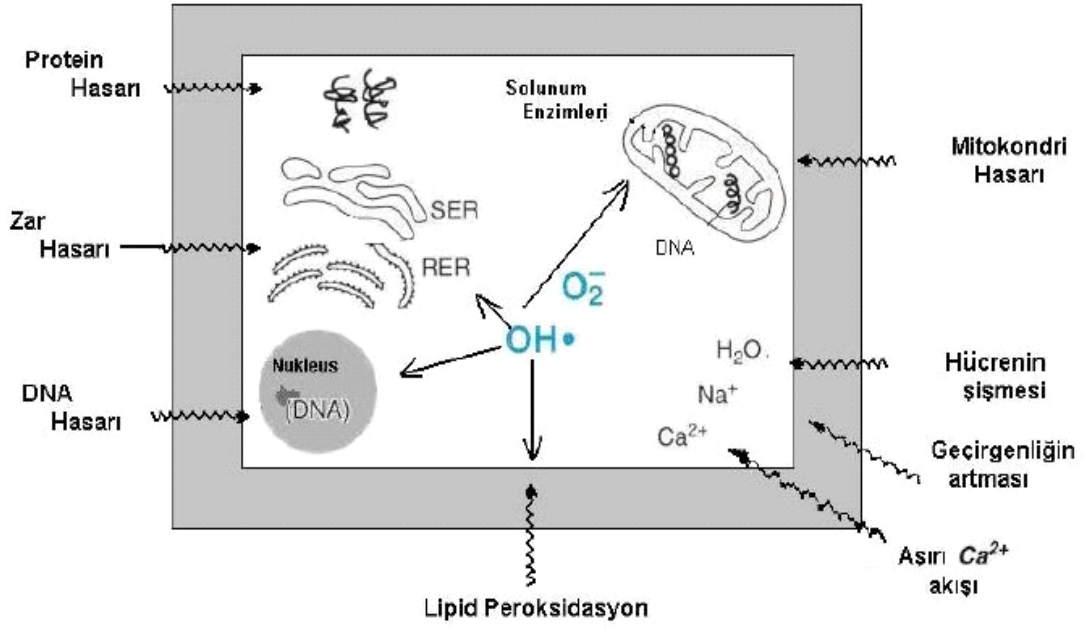
Serbest radikal gibi davranan, ancak serbest radikal tanımına uymayan oksijen kaynaklı hidrojen peroksit gibi hareketli moleküller, reaktif oksijen türleri (ROT) olarak isimlendirilirler. ROT, organizmada enzimatik reaksiyonlar ve metabolik fonksiyonlar için gereklidir ancak hüresel yapılara zarar verebilirler (139).

Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), iki elektron alarak indirgenmesi ile de hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), nc elektron eklenmesi ile yüksek derecede reaktif hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ), dördüncü elektron ilavesi ile de su oluşur (140).



#### 2.4.1.Serbest oksijen radikallerinin etkileri

Ařırđ miktarda üretilen reaktif oksijen türleri direk proteinlere zarar vererek hüresel hasara neden olur ve indirek olarak daha zararlı reaktif türleri oluşturarak radikal zincir reaksiyonlarını başlatır (140). Enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncđ ( $pO_2$ ), ozon ( $O_3$ ),  $NO_2$ , kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarđlar reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırđrlar. Serbest radikaller hücrelerin protein, karbonhidrat, lipid, DNA ve enzim gibi tüm önemli yapılarına etki ederler (141).



**Şekil 5:** Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri

*Karbohidratlara Etkileri:* Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitler oluşur. Açığa çıkan okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek, kanser ve yaşlanmaya sebep olabilirler (142).

*Proteinlere Etkileri:* Proteinler radikallerin etkilerine, lipitlere göre daha az duyarlıdır. Protein oksidasyonu, peptit bağlarının veya amino asit yan zincirlerinin ROT veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu oluşur. Özellikle doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle etkileşimi fazladır. Bu reaksiyonlar sonucunda albumin ve IgG gibi çok sayıda disülfid bağları içeren proteinlerin tersiyer yapıları ve fonksiyonları bozulur. Protein yapısındaki enzimlerde ise aktivite değişikliklerine neden olur (143).

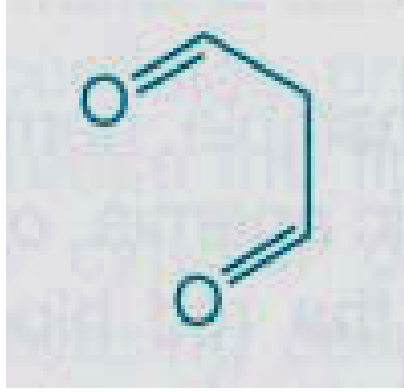
*DNA Üzerine Etkileri:* OH<sup>-</sup> iyonu DNA da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli mutajenik ürünler oluşturur. Yine OH<sup>-</sup> iyonu DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal oluşumuna neden olur. DNA'nın baz ve şekerlerinde ciddi hasarlar oluşturarak DNA iplik kırılmalarına yol açarlar. Hücre koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyecek kadar kapsamlı hasar sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelir (144).

*Lipidlere etkileri:* Reaktif oksijen türlerinden en çok etkilenen lipitlerdir. Hücre membranları poliansatüre yağ asitlerinden (PUFA) ve kolesterolden zengin oldukları için kolaylıkla oksidan radikallerden etkilenirler. Lipit peroksidasyonu; doymamış lipitlerin bulunduğu yerlerde, moleküler oksijenin de katıldığı reaksiyonlarla gerçekleşen ve lipit hidroperoksitlerinin oluştuğu kompleks bir işlemdir. Lipit peroksidasyonu otokatalitik ve geri dönüşümsüz bir reaksiyon olduğundan oldukça zararlıdır (145).

Hidroksil radikali gibi ROT de bütün moleküllere zarar verebilirler fakat asıl hedefleri lipid peroksit formasyonunun prekürsörü olan poliansatüre yağ asitleri (PUFA)'dir (146). Lipit peroksidasyonu, zar yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asit zincirinden bir hidrojen atomunun koparılmasıyla başlar ve lipit radikali oluşur. Lipit radikali zayıf bir bileşiktir ve birçok değişikliğe uğrar. Lipit peroksit radikalleri (LOO<sup>•</sup>) diğer çoklu yağ asitlerini etkileyerek, yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açar ve ortaya çıkan hidrojen atomu ile birleşerek lipit hidroperoksitlerini (LOOH) meydana getirirler. Peroksitler otokatalitik zincir reaksiyonunu başlatır ve böylece şiddetli zar hasarı oluşur (139).

Hücre zarlarında lipit peroksidasyonu sonucu zar transport sistemi bozulmakta, hücre içi ve dışı iyon dengeleri değişmektedir. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artması sonucu proteazlar aktive olmaktadır. Bu olaylar hücre hasarında etkin bir rol oynamaktadır. Lipit peroksidasyonun son ürünü olan aldehitlerin de sitotoksik etkileri vardır (140,147).

Bir dokuda lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için tiobarbitürik asit reaktanları olarak adlandırılan reaksiyon ürünleri olan lipid peroksitlerini ölçebiliriz (146). Aldehidler bilinen en toksik ürünlerdir. Lipid peroksidasyonu ile oluşan ürünlerin tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmeleri sonucu malondialdehit (MDA) açığa çıkar. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir. MDA'nın proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidlere veya nükleik asitlere bağlanması sonucu toksik etkileri oluşmaktadır. MDA düzeyi doku, kan ve vücut sıvılarında ölçülerek lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (148).



**Şekil 6:** Malondialdehitin kimyasal yapısı (149).

#### **2.4.2. Nitrik Oksit (NO):**

En basit biyolojik aktif moleküllerden biri olan NO, NOS enzimi tarafından sentezlenir. NO sentezlendiği yerde çok kısa bir sürede nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) ve daha sonra da nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) okside olduğu için, NO son ürünleri olan  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{NO}_3^-$  biyolojik sıvılarda ölçülerek NO üretiminin invivo ve invitro belirleyicisi olarak kullanılabilir (150).

NO aminoasitlerdeki ve proteinlerdeki tiyol (-SH) grupları ile reaksiyona girerek sabit nitrozotiyolleri oluşturur. NO üretimindeki azalma oksidatif fosforilasyonu uyarır ve periferik oksijen kullanımını artırır (151). NO süperoksit ( $\text{O}_2^-$ ) gibi serbest oksijen radikalleri ile de etkileşir.  $\text{O}_2^-$  ile eşleşir ve zararlı bir bileşik olan  $\text{ONOO}^-$  oluşur (152). Peroksinitrit aromatik aminoasitleri, okside tiyolleri ve lipidleri hidroksiller, proteine bağlı ve serbest tirozin rezidülerini nitratlar (153). Bu reaksiyonlar NO'nin yüksek oksidatif hasar oluşturma kapasitesini gösterir. Bunun tersine NO, lipid peroksil ve alkoksil radikallerinin zincirini sonlandırarak ve antioksidan enzim indüksiyonu yapan hücre sinyallerini düzenleyerek oksidasyon reaksiyonlarını doğrudan inhibe de eder. Düşük NO konsantrasyonları düz kas gevşemesi gibi birçok fizyolojik olayda rol alırken, yüksek NO konsantrasyonları, özellikle oksidanların arttığı durumlarda,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  ve diğer nitrozan, oksidan araçların üretimi ile doku hasarı ve inflamasyona yol açar (154). Lipit peroksidasyonu, bazı moleküllerin nitrozilasyonu, sodyum kanallarının inaktivasyonu ve demir, bakır gibi redoks potansiyeli olan metallerle reaksiyona girerek hücresel yapılara zarar verir (155).

NO inhibisyonu ile ONOO<sup>-</sup> oluşumu engellenerek kardiyak performans artırılabilirdiği gösterilmiştir (156). Bu sebeple, NO sentezini gerçekleştiren NOS'un (özellikle iNOS) pro-oksidan bir enzim olduğu düşünülmektedir. Melatoninin iNOS aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (24).

### **2.4.3. Oksidatif stres**

Organizmada, serbest radikaller (oksidan maddeler) ile antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge vardır ve bu dengenin oksidanların lehine bozulması durumuna, 'oksidatif stres' denir (103,157). Bir çok hastalık ve artmış toksisite sıklıkla değişik hayati organlarda oksidatif stresle ilişkilidir ve CAT, SOD, GSH-Px, GSH-R gibi spesifik enzim aktivitelerinde azalma ile karakterizedir (158).

Oksidatif stresin varlığı organizmada değişik yöntemlerle saptanabilir. Lipitler üzerine olan hasarın gösterilmesi için lipit peroksidasyonu ürünü malondialdehit (MDA), protein hasarını göstermek için protein karbonil (PC), DNA hasarını göstermek için 8-hidroksi-deoksiganosin ölçümü kullanılmaktadır (140).

### **2.4.4. Antioksidanlar**

Bir savunma mekanizması olarak, hücreler enzimatik ve nonenzimatik mekanizmalarla toksik ROT'ne karşı savaşırlar. Bu yüzden doku hasarı gelişmesi ROT oluşumu ile doku antioksidan durumu arasındaki dengeye bağlıdır (159).

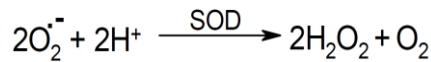
Antioksidan moleküller endojen veya ekzojen kaynaklı yapılar olup, oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile ortadan kaldırırlar. Enzimatik olmayan hücre içi antioksidanlar; albümin,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, askorbat, transferin, glutatyon (GSH), bilirubin, seruloplazmin, ubiquinoller, flavonoidler ve ürik asit gibi çeşitli moleküller sayılabilir. Ancak asıl antioksidan savunmayı enzimatik yapıda olan antioksidanlar oluşturmaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-R), katalaz (CAT) ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir. Antioksidan moleküller, serbest radikallerle reaksiyona girerek yeni bir radikal oluşturup, dokulara zarar vermeyen, reaktif olmayan özellik kazandırır (160).

Antioksidan sistem; enzimler, metal iyonlarını bağlayan proteinler, su ve yağda çözünen radikal tutucuları olarak sınıflandırılabilirler (140). (Tablo 3).

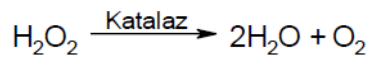
**Tablo 3:** Organizmada bulunan antioksidan sistem elemanları (140).

Enzimler	Metal iyonlarını bağlayan proteinler	Suda çözünen radikal tutucuları	Yağda çözünen radikal tutucuları
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Albumin	C vitamini	Bilirubin
Glutasyon redüktaz (GSH-R)	Ferritin	Glutasyon (GSH)	E vitamini
Glutasyon transferaz (GST)	Haptoglobin	Ürik asit	Flavonoidler
Katalaz	Seruloplazmin		β-Karoten
Süperoksit dismutaz (SOD)	Transferrin		Ubikinol

**Süperoksit dismutaz (SOD):** Süperoksit radikalini ( $O_2^{\cdot-}$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşümünü sağlayarak ortadan kaldırır. SOD organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzimdir. İnsanlarda SOD'un Cu-Zn ve Mn bağımlı iki izoenzimi bulunmaktadır. Cu ve Zn içeren tipi sitozolde, Mn içeren tipi ise mitokondride bulunur (140,147,161).

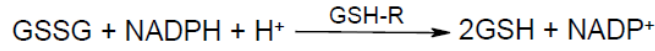
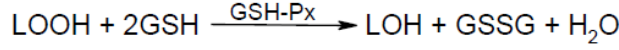


**Katalaz:** Peroksizomlarda bulunur. Yüksek konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler (162).

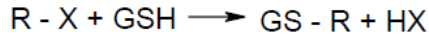


**GSH-Px:** Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) hidrojen peroksit ve lipit hidroperoksitleri metabolize etmektedir. GSH-Px'in selenyuma bağımlı ve selenyumdan bağımsız iki farklı türü vardır. Selenyuma bağımlı olan formu hem hidrojen peroksidin hem de LOOH'ların metabolizmasında görev alırken, selenyuma bağımlı olmayan türü sadece LOOH'ları metabolize etmektedir. GSH (Glutasyon), bu reaksiyonlarda hidrojen verici olarak görev yapmakta, hidrojen peroksit ve

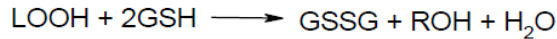
LOOH'lar indirgenirken, GSH oksitlenmiş şekline (GSSG) dönüşmektedir. NADPH'a bağımlı glutatyon redüktaz (GSH-R) ise oksitlenmiş glutatyonu tekrar GSH'a indirgemektedir (140,147,161). GSH-Px, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi mitokondride suya (H<sub>2</sub>O) çevirir (162).



**GST:** Glutatyon-S-Trasferaz (GST) enzimi dimerik yapıda olup sitozolde bulunur ve çok sayıda izoenzimi vardır. Çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu kataliz eden GST'lerin yabancı maddelerin biyotransformasyonunda önemli rolleri vardır.



GST'lerin bazı izoenzimleri GSH-Px aktivitesi gösterirler ve böylece LOOH'ların metabolizmasını da sağlarlar (140,147,161).



**Glutatyon (GSH):** Glutamat, sistein ve glisinden sentezlenen bir tripeptiddir. GSH hücre için en önemli antioksidan moleküldür ve serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur. GSH-Px, GSH-R ve GST gibi enzimlerin fonksiyonu için gereklidir. Ayrıca hücrenin protein yapısındaki sülfhidril (- SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller. GSH aminoasitlerin membrandan taşınmasında da rol alır (140,147,161).

GSH hidrojen peroksitin peroksizomlar dışında inaktivasyonu için özellikle karaciğer ve böbrekte en önemli enzimdir. Karaciğer GSH'ın en büyük kaynağıdır, ksenobiyotiklerin metabolizması karaciğerde olduğu için büyük ölçüde karaciğerde tüketilir ve diğer dokularda da bulunur (163).

Tam kanda GSH ölçerek oksidatif stresin bir belirtecini elde etmiş oluruz (164). GSH toksik peroksit ve aldehytleri direk ortadan kaldırır ve serum antioksidanlarını dolaylı olarak korur. Redükte GSH (fonksiyonel form) ölçümü oksidatif stres indeksini en iyi bilmemizi sağlar (165).



**E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol ):** Vitamin E bir peroksil radikal temizleyicisidir lipid peroksidasyonunun serbest radikal zincir reaksiyonu inhibitörlerinden en önemlilerinden birisidir, bu ona biyolojik membranların korunmasında önemli bir görev vermektedir (166). Vitamin E, lipid peroksidasyonunun erken aşamasında serbest radikal türlerini yok ederek ya da oluşumlarını engelleyerek oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturur (167). Vitamin E ve GSH-Px, endojen peroksitlerin neden olduğu hasardan hücreyi korurken benzer ve tamamlayıcı fizyolojik role sahiptirler (168).

Vitamin E, radikallerin yok edilmesi, zincirin kırılması, baskılama, bozulan yapıların onarılması ve endojen savunma sistemlerinin güçlendirilmesi gibi mekanizmaların tamamını kullanan çok geniş bir yelpazede antioksidan kapasiteye sahip bir moleküldür (167).

**C vitamini (Askorbik Asit) :** Vitamin C peroksil radikallerini yakalama yeteneğinden dolayı insan kan plazmasında sulu ortamların en etkili antioksidanıdır, böylece lipid peroksidasyonunu engeller (169). Su bazlı ortamlarda geniş antioksidan kapasitesine sahip olan vitamin C, lipid ortamların güçlü antioksidanı olan vitamin E' nin antioksidan etkisini artırarak vücut sıvılarının primer antioksidan savunmasında rol alır (170). Vitamin C' nin singlet oksijen, süperoksit, hidroksil, hidroperoksit, lipid peroksit ve lipid alkoksil radikallerini ortamdan temizleyerek antioksidan etkisini gösterdiği belirtilmektedir (171). Vitamin C, antioksidan görevlerinin yanı sıra  $Fe^{+3}$ 'ü, lipid peroksidasyonunu arttıran  $Fe^{+2}$ 'ye dönüşmesinde rol alarak oksidan bir özellik de göstermektedir (172).

### 3.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma için 20 adet beyaz tavşan kullanıldı. Çalışmamız, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde, 1986 Uluslararası Strazburg Hayvan Hakları Evrensel Beyannamesi şartlarına uygun olarak, Gaziosmanpaşa Üniversitesi'nden Etik Kurul onayı (2012 HADYEK- 010) alınarak veteriner hekim kontrolünde yapıldı.

Tavşanlar üç gruba ayrıldı.

Grup I, kontrol grubu olarak seçildi, 5 tavşan bulunduruldu, salin intraperitoneal olarak enjekte edildi.

Grup II, 7 tavşan bulunduruldu, metilprednizolon 20 mg/kg/gün tek doz intramusküler olarak enjekte edildi

Grup III, 8 tavşan bulunduruldu, 20 mg/kg/gün tek doz intramusküler metilprednizolon enjeksiyonundan önce başlanılarak, 20 mg/kg dozunda melatonin intraperitoneal olarak 14 gün boyunca gūnaşırı tek doz şeklinde verildi.

14. gün tavşanlar inramusküler olarak verilen 30 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg ksilazin ile derin anestezi altında göğüs kafesleri açıldı ve kalp dokuları çıkartıldı. Alınan örnekler çalışma için en kısa sürede biyokimya laboratuvarına ulaştırılarak çalışma zamanına kadar – 80 °C'de muhafaza edildi. Kalp dokusu homojenizasyonu sonucu elde edilen homojenatlardan antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve oksidatif moleküller olan malondialdehit (MDA), protein karbonil (PC), nitrik oksit (NO) düzeyleri çalışılmıştır.

#### 3.1. Biyokimyasal İnceleme

##### Kalp Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi

Kalp doku örnekleri 1/10 oranında 50 mM Tris-HCl (pH=7.4) tampon kullanılarak, buz içinde, soğuk ortamda homojenize edilmiştir (173). Hazırlanan homojenatların bir kısmından protein karbonil (PC) , malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri ölçümü yapılmıştır. Homojenatların bir kısmı ise, soğutmalı santrifüjde + 4 °C'de 3.500 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Elde edilen süpernatantlardan glutatyon peroksidaz (GSH-PX) ,katalaz (CAT) ve doku protein düzeyi ölçümü yapılmıştır.

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini belirlemek için bir kısım süpernatant, kloroform/etanol karışımı ile 1/1 (v/v) oranında karıştırılıp, 3500 rpm'de +4°C'de 40 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte oluşan etanol fazı kullanılarak protein ve SOD enzim aktivite ölçümü yapıldı (174).

### 3.1.1. Doku Protein Düzeyi Ölçümü

Protein düzeylerinin tayini Lowry yöntemi ile yapıldı (175). Bakır-protein kompleksi alkali çözeltide oluşarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk meydana getirir. Oluşan rengin yoğunluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifi kullanılırken dikkat edilmesi gerekenler; bu reaktif sadece asit ortamda dayanıklıdır, fakat bahsedilen bu redükleme ise pH 10'da oluşmaktadır, bu nedenle folin reaktifi hızlı bir şekilde alkali bakır-protein çözeltisine ilave edilmeli ve karıştırılmalıdır. Bu şekilde kullanım ile Folin reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir.

#### Kimyasallar:

Folin ciocalteu's fenol reaktifi, Bovine serum albumin, NaOH, CuSO<sub>4</sub>,  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

#### Ölçüm yöntemi:

Konsantrasyonunu bildiğimiz bovine serum albuminden hazırlanmış çözeltiler kullanılarak standart grafiği elde edildi. "Optik dansite (OD) mg/ml protein konsantrasyonu" grafiği çizilerek protein değerleri bu grafikten elde edildi. Örnek tüplerine 0,01 mL numune konuldu ve üzerlerine 0,49 mL distile su eklendi. 0,5 mL distile su da kör tüpüne konuldu. Hazırladığımız ölçüm reaktifi 2,5 mL olarak deney tüplerine dağıtıldı. Alt üst edilerek karıştırılan tüpler 10 dakika inkübasyona alındıktan sonra deney tüplerine 0,25 mL hazırlanan Folin ciocalteu's fenol reaktifi ekleyip tekrar 30 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Süresi dolan standart ve numuneler köre karşı 700 nm'de okundu.

#### Hesaplama

Protein (mg/ml) = grafikten okunan değer x faktör

F (faktör) = standart hacmi (0,5 ml)/ numune hacmi (0,010 ml) = 50

Not: Kullanılan numune miktarına göre faktör değişir. Numunenin miktarı değişirse, distile su hacmi ile ters orantılı olarak tüpe ilave edilir.

### 3.1.2. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Ölçümü

Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve 90 °C’de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek pembe renkli kromojen oluşturur. Oluşan pembe renkli bileşiğin 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçümüne göre MDA düzeyinin tayini yapıldı (176).

#### Kimyasallar

% 0,675’lik Tiyobarbitürik asit (TBA), %10’luk Trisiklik asetik asit (TCA), Stok standart solüsyonu (1,1,3,3 tetra metoksipropan)

#### Ölçüm Yöntemi

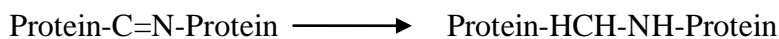
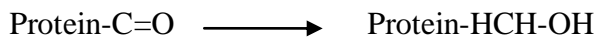
Kapaklı cam deney tüplerine 2,5 ml %10’luk TCA konulduktan sonra üzerlerine 0,5 ml numune ilave edilerek vorteksle karıştırıldı. Elde edilen karışımların ağızları kapatılarak 90 °C’de 15 dakika inkübasyonda bırakıldıktan sonra soğuk su altında soğutulurak 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Sonra elde edilen süpernatantlardan 2 ml ayrı tüplere alınarak üzerlerine % 0,675’lik TBA eklendi ve tekrar 90 °C’de 15 dakika inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon süresi dolduktan sonra tekrar soğuk su altında soğutulan numuneler, 532 nm’de köre karşı okutuldu. Kör tüpüne numune yerine 0,5 ml distile su konularak aynı işlemler yapıldı.

#### Hesaplama

MDA (nmol/ g.yaş doku) = (Örnek OD/Standart OD) x Standart Konsantrasyonu

### 3.1.3. Doku Protein Karbonil ( PC) Düzeylerinin Ölçümü

Protein karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyonu sonucu 2,4-dinitrofenilhidrazon oluşması prensibine dayanarak, protein karbonil grubu düzeyleri spektrofotometrik olarak (370 nm) ölçülmüştür (145).



### Kimyasallar

%20 TCA, , 10mM 2,4 DNPH (2M HCl'de hazırlandı), 2M HClEtanol/Etil asetat (1/1), 100 mM NaOH

### Ölçüm Yöntemi

0,5 mL numune, 1,5 mL'lik eppendorf tüplerine konularak üzerine 0,5 mL %20'lik TCA eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Mevcut karışım 11000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra oluşan süpernatantlar dikkatlice dökülerek pelletleri bırakıldı. Bırakılan pelletlerin her birinin üzerine 10mM 2,4 dinitrofenilhidrazin (2M HCl'de hazırlandı) ilave edildi ve oda ısısında 1 saat bekletildi. Bu süre içerisinde reaksiyon gerçekleşmesi için, her 10-15 dk'da bir numuneler vorteksle karıştırıldı. 1 saat dolduktan sonra numunelerin üzerine 0,5 mL %20'lik TCA eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Sonra 11000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar pelletlerinden dikkatli bir şekilde ayrıldı. Kalan pelletlerin üzerine 1 mL etanol-etil asetat eklenip vorteks ile karıştırıldı ve 10 dk. Beklendikten sonra 11000 rpm 3 dk santrifüj edildi. Etanol-etil asetat basamağı numunelere 3 kere tekrar edildi. Bu basamak sonrası elde edilen süpernatant pelletinden ayrıldı ve üzerine 0,9 mL 100 mM NaOH ilave edilip 15 dk 37 °C'de çalkalayıcıda çözdürüldü. Sonra, çözünmeyenleri çöktürmek için 11000 rpm'de 5 dk santrifüj edip, 370 nm'de numuneler köre karşı okundu.

### Hesaplama

Protein karbonil düzeyleri nmol/ml olarak hesaplandı. Hesaplamalar sırasında 2,4-dinitrofenilhidrazin için 370 nm'de molar absorpsiyon katsayısı  $s = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  alındı. Doku örnekleri için bu sonuçlar Lowry metoduyla ölçülen protein miktarları kullanılarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.

$$\text{Karbonil (M)} = [(AbsN - AbsC) / 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}] \times (16 \times 10^6)$$

Protein karbonil (nmol/mg protein) = Karbonil (nmol/ml) / Protein (mg/ml)  
(Doku örneklerinin hesabı için)

### **3.1.4. Doku Nitrik Oksit (NO) Düzeylerinin Ölçümü**

Nitrik oksit, üretildiği ortamda çok kısa bir sürede okside olarak önce nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) daha sonrada nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) dönüştüğü için endojen olarak, vücutta üretilen

nitrik oksitin doku ve vücut sıvılarındaki miktarı, pek çok çalışmada nitrit ve nitrat olarak belirtilmiştir (177). Proteinden zengin homojenat, serum ve plazma gibi sıvılarda Griess reaksiyonu ile ölçümlerde muhtemel nonspesifik reaksiyonları engelleyebilmek için numuneleri önce deproteinize edip daha sonra nitrit ve nitrat düzeyleri çalışıldı (178).

Deproteinizasyondan sonra nitrit ve nitrat miktarları Griess reaksiyonu ile belirlendi (179). Total nitrit (nitrit+nitrat) düzeyi modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile belirlendi. Bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri pH 9,7 glisin tamponunda deproteinize numune süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyona bırakılarak nitratın redüksiyonu sağlandı. Üretilen nitrit düzeyi; sülfanilamid ve buna bağlı N-naftiletillen diamin (NNDA) diazotizasyonu ile reaksiyon sonu oluşan pembe bir rengin spektrofotometrede 545 nm dalga boyunda okunması ile tayin edildi.

#### Nitrit Standartlarının hazırlanması

0,1 mol/L NaNO<sub>2</sub> (sodyum nitrit) stok solüsyon olup oda ısısında 9 ay süreyle stabildir. Standart solüsyonundan değişik oranlarda dilüsyon yapılarak, standart eğri çizildi.

#### Kimyasallar

Çalışma reaktifi: Sülfanilamid, 5 mmol/L CuSO<sub>4</sub>, pH 9,7 Glisin-NaOH tamponu, Kadmiyum granülleri (Cd), N-naftiletillen diamine (NNDA), 0,1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> standart solüsyonu (0,1 mol/L NaNO<sub>2</sub>, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> içinde çözülür.)

#### Kadmiyumların aktifleştirilmesi

Kadmiyumlar, 20 mililitrelik plastik tüplere (ağız kapatılan) 2,5-3 gr olarak dağıtılır. Kadmiyum granülleri 3 kez deiyonize su ile yıkanır. CuSO<sub>4</sub> solüsyonu içinde 1-2 dakika bekletildikten sonra solüsyon tekrar süzülerek dökülür. 3 kez glisin tamponu ile yıkanır. Aktifleştirilen granüller 10 dk içinde kullanılır. Granüller kullanıldıktan sonra hemen distile su ile yıkanır ve sülfirik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) solüsyonu içinde saklanır.

#### Ölçüm Yöntemi

Deproteinizasyon işleminin yapılması: 250 µL numune + 1 mL ZnSO<sub>4</sub> (75 mmol/L) karışımı vortekslenir. Üzerine 1,250 mL NaOH (55 mmol/L) ilave edilip tekrar vortekslenir ve 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Elde edilen süpernatant numune olarak kullanılır.

Glisin tamponu ile yıkanmış aktif granül tüplerinin üzerine 1 mL glisin tamponu eklenir. Üzerine 1 mL deproteinize numune konur ve 2 mL distile su eklenir. Oda ısısında 90 dakika inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda ayrı bir tüpe, 2 mL alınıp üzerine 2,5 ml distile su ve 1 mL sülfanilamid, 1 mL NNDA ilave edilerek tekrar 1 saat inkübasyona bırakılır. İkinci inkübasyon süresi dolduktan sonra 545 nm'de köre karşı okunur. Elde edilen veriler NO metabolitlerinin toplam konsantrasyonunu göstermektedir ve  $\mu\text{mol/L}$  ile  $\mu\text{mol/g}$  yaş doku olarak sonuçlar kaydedilir.

### 3.1.5. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Ölçülmesi

Sun ve arkadaşlarının yöntemi ile Durak ve arkadaşlarının yapmış olduğu modifikasyona göre süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi düzeyi ölçüldü (174,180).

Bu yöntemde, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin, nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanarak SOD aktivitesi tespit edilir. Ortaya çıkan süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Meydana gelen kompleks 560 nm'de maksimum absorbands verir. Eğer ortamda enzim yoksa bu indirgenme meydana gelip mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD varsa NBT indirgenmesi gerçekleşmeyip mavi-mor renk açığa çıkmamakta ve enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır.

$$\text{Enzimin \% inhibisyonu} = (\text{Abs}_{\text{kör}} - \text{Abs}_{\text{num}}) / \text{Abs}_{\text{kör}} \times 100$$

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak verildi.

#### Kimyasallar

400 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1 g/L bovine serum albumin, 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,8 mmol/L  $\text{CuCl}_2$ , 150  $\mu\text{mol/L}$  NBT, 0,3 mmol/L xanthine, 0,6 mmol/L EDTA (2 Na tuzu), xanthine oxidase (XO)

#### Ölçüm yöntemi

Deney tüplerine kimyasallar kullanılarak hazırlanan ölçüm reaktifinden 2,85 mL konuldu. Üzerlerine 0,1 mL numunelerin ekstraktlarından eklendi. Kör tüpüne ekstrak yerine 0,1 mL distile su konuldu. Sonra tüm karışımların üzerine 0,05 mL ksantin oksidaz ilave edilip, hızlı bir şekilde alt üst edilerek karıştırıldı ve oda ısısında 20 dakika inkübasyona alındı. İnkübasyon süresi dolan tüplere bekletilmeden

stop solüsyonu olarak 0,1 mL bakır klorür eklendi ve numuneler köre karşı 560 nm'de okundu.

#### Hesaplama

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(\text{Absorbans kör } \{K\} - \text{Absorbans Örnek } \{Ö\})] / K \times 100$$

% 50'lik inhibisyona 1 U denildiği için

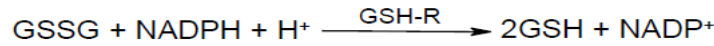
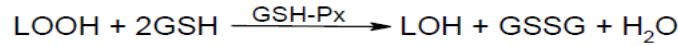
$$\text{Aktivite (U/ml)} = [(\% \text{ inhibisyon}/50) \times (1 / 0,1)] \quad \text{ml.}$$

$$\text{U/ml} = [(K - Ö) / K] \times 20 \times 5 \text{ (sulandırma faktörü)}$$

$$\text{Spesifik aktivite (U/ mg protein)} = [\text{U/mL} / \text{mg/ml protein}]$$

### **3.1.6. Doku Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesinin Ölçümü**

Paglia ve arkadaşlarının yöntemine göre glutasyon peroksidaz aktivitesi ölçüldü (181). Hidrojen peroksit bulunan ortamda GSH-Px redükte glutasyonun (GSH) okside glutatona (GSSG) yükseltgenmesini katalizler. GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. NADPH'nin NADP'ye yükseltgenmesi sırasında absorbans seviyesindeki azalmanın, 340 nm'de okunmasıyla GSH-Px aktivitesi belirlenir.



Enzim Ünitesi: NADPH'in birim zamanda okside olan mikromol miktarıdır.

#### Kimyasallar

50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fosfat tamponu (pH = 7,50 mM), GSH-Redüktaz, 3,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150 mM redükte GSH, 8 mM NADPH, 1 M NaN<sub>3</sub> (Sodyum azid)

#### Ölçüm yöntemi

Hazırlanan deney tüplerine; 2,650 mL EDTA'lı fosfat tamponu,

0,1 mL redükte GSH,

0,1 mL NADPH,

0,01 mL GSH-Redüktaz,

0,01 mL NaN<sub>3</sub>,

0,02 mL numune



Karışımları hazırlanarak 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra deney tüplerine 0,1 mL hidrojen peroksit ilave edilip, 5 dakika boyunca dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede, numunelerin absorbans değerleri kaydedildi. Aktivite azalışının lineer olduğu absorbans aralığının 1 dakikalık süresi esas alınarak hesaplamada kullanıldı.

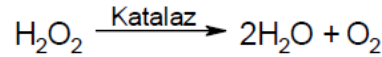
#### Hesaplama

$$\text{IU/L} = [(\Delta A/t)/6,22 \times 10^{-6}] \times (1 / 0,02)$$

$$\text{Spesifik aktivite IU/mg protein} = (\text{IU/L}) / (1000 \times W)$$

### **3.1.7. Doku Katalaz (CAT) Aktivitesinin Ölçümü**

Aebi yöntemine göre katalaz aktivitesi tayin edildi (182). Hidrojen peroksit 240 nm'de maksimum absorbans verir. Deney ortamına ilave edilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, katalaz aracılığıyla su ve oksijene parçalanmakta ve bu olay kendini ultraviyole spektrumunda absorbans azalması olarak göstermektedir. Absorbanstaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. Reaksiyon şu şekildedir:



#### Kimyasallar

Fosfat tamponu (pH 7,50 mM) ve absorbansı 0.500 nm'ye ayarlanmış olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'li fosfat tamponu

#### Ölçüm yöntemi

240 nm dalga boyunda, fosfat tamponuna göre sıfırlanan köre karşı, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi optik dansite 0,500'e ayarlandı. Kör tüpüne 2,99 ml fosfat tamponu konuldu ve üzerine 0,01 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi eklenerek kör oluşturuldu. Numune tüplerine de, 2,99 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi ve üzerine 0,01 mL numune eklendi. Absorbans azalması her 15 sn'de bir 2 dakika süre ile kaydedildi. Hesaplamada 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının değerleri dikkate alındı.

#### Hesaplama

$$k = \{ [2,3 \times \log (\text{OD}_1 / \text{OD}_2)] / \Delta t (\text{sn}) \} \text{ k/mg protein} = k / [(\text{mg/ml protein}) \times 1000]$$

## **İstatistiksel Analiz**

Gruplarda bakılan her bir parametrenin normal dağılıma uygunluğu tek örneklem Kolmogorov-Smirnov testi kullanarak belirlendi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar tek yönlü Varyans Analizi kullanılarak, LSD veya Tamhane testi ile yapıldı. Tüm analizler SPSS version 15.0 software kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi.  $P < 0.05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Doku (Kalp) MDA Düzeyleri:

Kalp dokusu MDA düzeyi yalnız metilprednizolon grubunda (grup 2) kontrol grubuna (grup1) kıyasla artmış bulunmuştur.

Melatonin-metilprednizolon verilen grupta (grup 3) doku MDA düzeyi yalnızca metilprednizolon verilen gruba kıyasla azalmış bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Melatonin-metilprednizolon grubunda kontrol grubuna kıyasla artmış olarak bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Tablo 4).

**Tablo 4:** Doku MDA Düzeyleri (Ortalama±standart sapma )

MDA (nmol/g protein)	Ort ± SS	Numune sayısı
<b>KONTROL</b>	1,62±0,44	5
<b>METİLPREDNİZOLON</b>	1,74±0,45	7
<b>METİLPREDNİZOLON+MELATONİN</b>	1,65±0,35	8

### 4.2. Doku (Kalp) PC Düzeyleri:

Kalp dokusu PC düzeyi metilprednizolon grubunda kontrol grubuna kıyasla azalmış bulunmuştur.

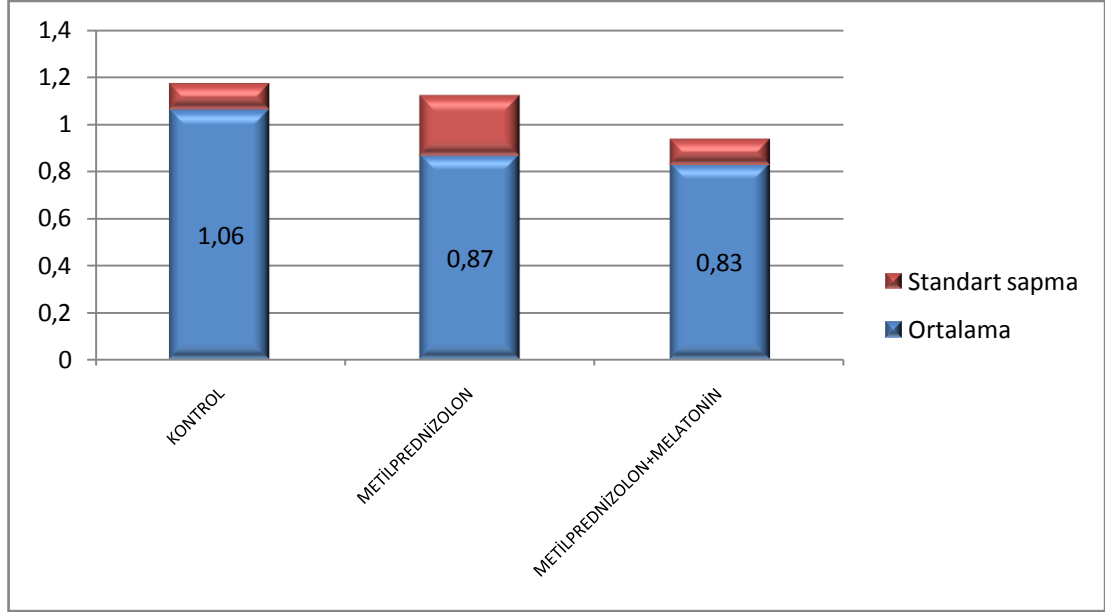
Melatonin-metilprednizolon verilen grupta yalnız metilprednizolon grubuna kıyasla azalmış olarak bulunmuştur.

Metilprednizolon-melatonin grubunda kontrol grubu ile karşılaştırılmasında azalmış olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0,031).

**Tablo 5:** Doku PC Düzeyleri (Ortalama±standart sapma )

PC (nmol/mg protein)	Ort ± SS	Numune sayısı
<b>KONTROL</b>	1,06±0,11	5
<b>METİLPREDNİZOLON</b>	0,87±0,25	7
<b>METİLPREDNİZOLON+MELATONİN</b>	0,83±0,11	8

### PC (nmol/mg protein)



**Grafik 2:** Doku PC Düzeyi ( Kontrol grubuna kıyasla metilprednizolon+melatonin grubunda anlamlı azalma  $p=0,031$ )

#### 4.3. Doku (Kalp) NO Düzeyleri:

Kalp dokusu NO düzeyi, metilprednizolon grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında değişmemiş olarak bulunmuştur.

Melatonin-metilprednizolon verilen grupta diğer iki gruba göre azalmış olarak bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. (Tablo 6).

**Tablo 6:** Doku NO Düzeyleri (Ortalama±standart sapma )

NO ( $\mu\text{mol/g protein}$ )	Ort $\pm$ SS	Numune sayısı
KONTROL	0,09 $\pm$ 0,02	5
METİLPREDNİZOLON	0,09 $\pm$ 0,02	7
METİLPREDNİZOLON+MELATONİN	0,08 $\pm$ 0,01	8

#### 4.4. Doku (Kalp) SOD Düzeyleri:

Kalp dokusu SOD aktivitesi, metilprednizolon grubu ve metilprednizolon-melatonin gruplarında kontrol grubuna kıyasla değişmemiş olarak bulunmuştur.

Kalp dokusu SOD aktivitesi için kontrol grubu ile diğer 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. (Tablo 7).

**Tablo 7:** Doku SOD Aktivitesi Düzeyleri (Ortalama±standart sapma )

SOD (U/mg protein)	Ort ± SS	Numune sayısı
<b>KONTROL</b>	0,16±0,01	5
<b>METİLPREDNİZOLON</b>	0,16±0,02	7
<b>METİLPREDNİZOLON+MELATONİN</b>	0,16±0,01	8

#### 4.5. Doku (Kalp) GSH-Px Düzeyleri:

Kalp dokusu GSH-Px aktivitesi, metilprednizolon grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında artmış olarak bulunmuştur.

Melatonin-metilprednizolon verilen grupta GSH-Px düzeyi diğer iki gruba göre artmış olarak bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. (Tablo 8).

**Tablo 8:** Doku GSH-Px Aktivitesi Düzeyleri (Ortalama±standart sapma )

GSH Px (U/g protein)	Ort ± SS	Numune sayısı
<b>KONTROL</b>	4,01±0,58	5
<b>METİLPREDNİZOLON</b>	4,02±0,69	7
<b>METİLPREDNİZOLON+MELATONİN</b>	4,42±0,37	8

#### 4.6. Doku (Kalp) Katalaz Düzeyleri:

Kalp dokusu katalaz düzeyi metilprednizolon grubunda kontrol grubuna kıyasla artmış olarak bulunmuştur.

Melatonin-metilprednizolon verilen grupta katalaz düzeyi diğer iki gruba göre artmış olarak bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.(Tablo 9).

**Tablo 9:** Doku Katalaz Aktivitesi Düzeyleri (Ortalama±standart sapma )

<b>Katalaz (k/g protein)</b>	<b>Ort ± SS</b>	<b>Numune sayısı</b>
<b>KONTROL</b>	0,48±0,11	5
<b>METİLPREDNİZOLON</b>	0,71±0,23	7
<b>METİLPREDNİZOLON+MELATONİN</b>	0,74±0,29	8

## 5. TARTIŞMA

Glukokortikoidler antiinflamatuvar ve immünsüpresif etkilerinden dolayı (1) otoimmün hastalıklar, lenfoproliferatif hastalıklar, alerjik hastalıklar gibi çok geniş bir yelpazede sıklıkla kullanılırlar. Ancak glukokortikoidlerin ciddi yan etkilere sahip olmaları kullanımlarını kısıtlar (2,3).

Glukokortikoidlerin uzun süre yüksek düzeyde salınımı kronik stres durumunu gösterir ve kalp damar ve metabolik hastalıklara yatkınlığı artırırken (4,5) muhtemel yaşam süresini de kısaltır (6). Glukokortikoidlerin uzun süreli kullanılması hafif, bazen de ciddi tansiyon yüksekliğine neden olur. Benzer şekilde cushing sendromlu hastalarda da sistemik hipertansiyon görülür (3). Yapılan çalışmalarda glukokortikoid uygulaması sonrası; kalp hızında istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme (71) , EKG’de PR mesafesinde kısalma ve bradikardi (72), QRS komplekslerinde genişleme, tam AV blok, idioventriküler ritm (73), ani ölümler (74), ortalama kan basıncı ve sistemik vasküler direnç düşüklüğü, kalp hızında artma (75) saptanmıştır.

Glukokortikoidlerin uzun süre yüksek salınımının oksidatif strese çok açtığı öne sürülmüştür (7,8). Glukokortikoidlerin TBA reaktanlarının seviyesini (9), doku antioksidan enzimlerinin seviyesini değiştirdiği bilinmektedir (10,11). Glukokortikoidlerin kalp, damar ve böbrek gibi değişik dokularda oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir (12-16).

Beyinle alakalı olarak, glukokortikoidler reaktif oksijen türlerinin varlığını hipokampal ve kortikal kültürde artırmış (85) ve bazal beyin antioksidan enzimlerinin aktivitesini azaltmıştır (86). İnvitro çalışmalar göstermiştir ki; glukokortikoid maruziyeti beyincik granüllü hücrelerde ve hipokampal nöronlarda oksidatif stresin indüklediği hücre ölümüne duyarlılığı artırmaktadır (87,88).

Glukokortikoidlerin neden olduğu damarsal hasarların ve hipertansiyonun antioksidan tedavi ile önlenmesi veya kısmen iyileştirilmesi glukokortikoidlerin istenmeyen yan etkilerine aracılık eden altta yatan mekanizmanın oksidatif stres olabileceğini desteklemektedir (15,16). Kalp yetmezliği olan hastalarda daha yüksek bir redoks durum varlığı ispatlanmıştır ve bu fonksiyonel parametrelerle koreledir, bu yüzden MDA düzeyleri ile ventriküler ejeksiyon fraksiyonu arasında ters ilişki vardır

(183). Hidrokortizon ile tedavi edilen tavuk embriyolarında TBA reaktanlarının lens (184), karaciğer (185) ve kanda (9) arttığı bildirilmiştir.

Pereira ve ark. yaptıkları bir çalışmada soleus kası ve dalağı içeren değişik organlara deksametazonun etkisini araştırmışlar. Deksametazon 1mg/kg vücut ağırlığı dozunda üç gün boyunca genç ratlara peritoneal olarak enjekte edilmiş. TBA reaktanları mezenterik lenf nodları, timus ve dalakta azalmış, gastrokinemius ve soleus kasında artmış. GSH-Px aktivitesi lenfoid organlarda artarken, her iki iskelet kasında da azalmış. Cu/Zn-SOD aktivitesi beş dokuda da azalmış. Katalaz aktivitesi timus ve mezenterik lenf nodlarında azalmış ancak diğer dokularda artmış. Glukokortikoidlerin tedavi edici etkinliklerinin bir nedeni de antioksidan enzimlerin aktivitesini düzenlemeleri olduğu sonucunu çıkarmışlar (186).

Vücudun antioksidan savunma sistemlerini güçlendirmeye yönelik antioksidan tedaviler değişik dokularda moleküler hasarı önlemek için sıklıkla başvurulan bir yöntemdir (187). Bir çalışmada, metilprednizolonun antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak glomerülleri oksidan hasardan koruduğu gösterilmiştir (188).

Glukokortikoidlerin fetal rat akciğerinde antioksidan enzimleri indüklediği ve böbrek antioksidan enzimlerinin olgunlaşmasını hızlandırdığı bilinmektedir (11). Glukokortikoidler gebelik sırasında verildiğinde antioksidan enzim üretiminin düzenlenmesinde prenatal dönemde önemli bir homeostatik rol oynadığı değerlendirilmiştir (189).

Glukokortikoidlerin değişik dokularda antioksidan enzimleri aktive ettiği bilinmektedir. Doğumda, akciğerlerde ani PO<sub>2</sub> artışına karşı antioksidan enzimlerin aktivitesi artar ve gebelik sırasında glukokortikoid uygulaması bu enzimlerin fetal maturasyonunu geliştirir (10,11,188,189).

Deksametazon uygulaması dokuya spesifiktir, CAT, GSH-Px, ve GSH'ı karaciğerde azaltırken, manganez-SOD'u (Mn SOD) beyin ve adipoz dokuda artırmaktadır (185).

Rajare ve ark. yaptıkları bir çalışmada; 2.5 mg/kg/hafta deksametazon 2 hafta süreyle ratlara gūnaşırı vermişler ve şunları saptamışlardır: 12 ve 16. günlerde deksametazon verildiği sürede ve kesildikten sonra TBA reaktanlarının seviyesi artmıştır. Kalp ve böbrekte glutatyon seviyesi 4. günden itibaren artmış ancak



tedavinin geç evrelerinde ve deksametazon bırakıldıktan sonra normale gelmiştir. Deneş süresince total sülfidril grupları anlamlı artış göstermiş. Katalaz, SOD, glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferaz gibi antioksidan enzimler deksametazon uygulaması sırasında kalpte anlamlı azalırken, tedavi sırasında ve tedavi bırakıldıktan sonra böbrekte anlamlı artmış olarak bulunmuş (13).

Orzechowski ve ark. yaptıkları bir çalışmada: 6 haftalık genç ratlara 2 mg/kg/vücut ağırlığı/gün dozunda ve 94 haftalık yaşlı ratlara 0.5 mg/kg/vücut ağırlığı/ gün dozunda deksametazon verilmiş. Genç ratlarda eritrositlerde GSH % 46 azalırken, soleus kası yaş dokusunda GSH %36 azalmış. Yaşlı sıçanlarda bu miktar sırasıyla % 35 ve % 26 olmuş. Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde deksametazonun direk ve veya indirek antioksidanlara zarar verdiği söylenebilir. Deksametazon verilen genç ratlardan elde edilen eritrositlerde Cu-Zn superoksit dismutaz (SOD-1) aktivitesinde anlamlı azalma (%50) görülmüş fakat yaşlı ratlarda SOD-1 aktivitesinde anlamlı artış (%101) görülmüş. Tiobarbitürik asit reaktan ürünleri genç ve yaşlı her iki grupta da anlamlı yüksek bulunmuş. Genç ve yaşlı her iki grup da oksidatif stresden kurtulmalarına rağmen, deney sonunda yaşlı ratlar genç ratların aksine katabolik kalmış. Sonuç olarak yaşlı ratlar deksametazonun katabolik etkilerine karşı daha duyarlı ama genç ratlar da deksametazonun indüklediği oksidatif strese daha yatkın olduğu iddia edilmiş (190).

Çaylı ve ark. yaptıkları bir çalışmada; ratlarda spinal kord zedelenmesi oluşturmuşlar, 30 mg/kg tek doz metilprednizolon (MP) ve 10 mg/kg tek doz melatonin kullanarak tedavi etmişler, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyini MP kullanılan grupta ve melatonin kullanılan grupta düşük bulmuşlar. Ancak kombine MP ve melatonin tedavisinin tek başına MP veya tek başına melatonin tedavisine göre lipid peroksidasyonu üzerine anlamlı şekilde daha etkili bulmuşlar (191).

Karlıdağ ve ark. gürültünün neden olduğu işitme kaybında serbest oksijen radikallerinin rolünü ve bu durumda melatonin ile metilprednizolonun proflaktik etkisini inceledikleri bir çalışmada; 50 adet erkek domuz kullanmışlar ve 5 grup oluşturmuşlar. Grup 1 hariç tüm gruplar 60 saat gürültüye maruz bırakılmış. Grup 1'e gürültü veya ilaç tedavisi verilmemiş, kontrol grubu olarak seçilmiş. Grup 2 gürültüye maruz kalmış ancak ilaç tedavisi verilmemiş. Grup 3 gürültü almış ve

melatonin ile tedavi edilmiş. Grup 4 gürültü almış ve metilprednizolon ile tedavi edilmiş. Grup 5 gürültü almış ve melatonin ve metilprednizolon ile tedavi edilmiş. Yüksek doz (40 mg/kg) metilprednizolon ve/veya 20 mg/kg melatonin intramusküler olarak gürültü maruziyetinden 24 saat önce, gürültü maruziyetinden hemen önce ve gürültü maruziyeti tamamlanana kadar günde bir kez uygulanmış. Grup 2’de (yalnızca gürültü grubu) grup 1’e (kontrol grubu) göre plazma ve kohlear doku MDA düzeyi yüksek, eritrosit glutatyon peroksidaz aktivitesi seviyesi düşük bulunmuş. Grup 2 (yalnızca gürültü grubu) ve grup 3 (gürültü+melatonin) karşılaştırıldığında MDA ve eritrosit glutatyon peroksidaz aktivitesi seviyesi arasında anlamlı fark bulunmuş, melatonin verilen grupta MDA düzeyi azalırken GSH-Px düzeyi artmış. MDA aktivite seviyesi grup 4 (metilprednizolon) ve grup 5 (metilprednizolon+melatonin)’de grup 2 (yalnızca gürültü)’ye benzer bulunmuş. Gürültünün neden olduğu kohlear hasarı önlemede metilprednizolonun yeterli profleksiyi sağlamadığı ancak melatonin kullanımının daha etkili bir profleksiyi sağladığı sonucuna ulaşımlar (192).

Camm ve ark. yaptıkları bir çalışmada; postnatal glukokortikoid tedavisinin beyin gelişimine zararlı etkilerini, oksidatif stresi ve antioksidan tedavinin bu yan etkileri nasıl etkilediğini incelemişler. 0.5, 0,3, 0.1 mg/kg/gün dozunda deksametazon, 200 mg/kg/gün dozunda C vitamini ve 100 mg/kg/gün dozunda E vitamini ratlara verilmiş. Deksametazon korteksde oksidatif stresi indüklemiş, ısı şok protein 70 (hsp 70), 4- hidroksinonenal (4-HNE) ve nitrotirosin (NT) düzeyleri artmış. Deksametazonla beraber antioksidan vitamin kullanıldığında total beyin volümündeki azalmada gelişme sağlanmış, Hsp70 ekspresyonu korteksde düzelmiş ancak 4- hidroksinonenal (4-HNE) ve nitrotirosin (NT) protein ekspresyonu yüksek kalmış. Prematür infantlarda kronik akciğer hastalıklarının tedavisinde, beyin gelişimi açısından, kombine glukokortikoid ve antioksidan tedavisinin tek başına glukokortikoid tedavisinden daha güvenli olduğu sonucuna ulaşımlar. Ancak antioksidan tedavi sağlıklı çocuklarda önerilmemektedir (193).

Arima ve ark. yaptıkları bir çalışmada; fetal ve neonatal rat akciğerinde prenatal deksametazon verilmesinin antioksidan enzimler ve nitrik oksit sentaz üzerine etkilerini incelemişler. Deksametazon (1 mg/kg, s.c., 2 gün süreyle) hamile ratlara verilmiş ve fetusların akciğerleri hamileliğin 19 ve 21. günlerinde,

yenidoğanların da doğumdan sonra 1 ve 3. günlerde incelenmiş. Manganez süperoksid dismutaz ve bakır-çinko süperoksit dismutaz (Mn SOD ve Cu-Zn SOD), GSH-Px, CAT ve indüklenbilir ve endotelyal nitrik oksit sentaz (i-NOS ve e- NOS) düzeyleri belirlenmiş. Dex grubunda, Cu-Zn SOD, Mn SOD, GSH-Px, CAT protein ekspresyonu anlamlı bir değişiklik göstermemiş. Deksametazon uygulaması kontrol grubu ile kıyaslandığında hamileliğin 19. gününde i-NOS protein ekspresyonunu ve i-NOS mRNA ekspresyonu anlamlı şekilde artırdığı görülmüş. Deksametazon uygulaması fetal dex kontrol grubu ile kıyaslandığında e-NOS protein ekspresyonunu ve e-NOS mRNA ekspresyonunu anlamlı olarak artırmış. Antenatal glukokortikoid tedavisinin akciğer gelişimini hızlandırmasını NOS bu iki tipi üzerinden yaptığı sonucunu çıkarmışlar (194).

Glukokortikoidlerin oksidan-antioksidan etkileri tek yönlü değildir. Bir taraftan oksidatif hasarı artırırken, diğer yandan antioksidan enzimleri artırabilmektedir. Örneğin GC, sığır glomerül hücrelerinde gen ekspresyonunu düzenleyerek SOD sentezini artırmaktadır (195). Hamilelik sırasında dex verilmiş maymunların yavrularında bazı aortik antioksidan enzimlerin mRNA ekspresyonu artmaktadır (196).

Yukarıdaki çalışmalardan da anlaşılacağı üzere glukokortikoidlerin oksidan-antioksidan sistem üzerine olan etkileri; glukokortikoidlerin veriliş süresine, veriliş dozuna, etkilenen organa göre değişkenlik arz etmektedir. Biz de yaptığımız bu çalışmada tek seferde verilen yüksek doz metilprednizolonun oksidan-antioksidan sistem üzerine etkilerini ve melatoninin muhtemel koruyucu etkilerini inceledik.

Serbest radikallere bağlı hücre hasarındaki en önemli mekanizmalardan biri lipid peroksidasyonudur. MDA lipid peroksidasyonu son ürünlerinden olup oldukça zararlı bir maddedir, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin bozulması ve DNA ile reaksiyona girerek mutajenik karakter kazanması gibi pek çok olumsuz etkiye sahiptir (197).

Yaptığımız bu çalışmada; yalnız metilprednizolon verilen grupta kontrol grubuna kıyasla doku MDA düzeyini artmış olarak bulduk. Bu sonuç diğer çalışmalarla paralel şekilde kortikosteroidlerin lipid peroksidasyonunu artırdığı sonucunu desteklemektedir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir veri elde edemememiz steroidin tek doz verilmesinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Eğer

tekrarlayan dozlarda çalışmaya devam edilseydi muhtemeldir ki istatistiksel olarak da anlamlı artmış MDA düzeyleri elde edilebilecektir.

Protein oksidasyonunda, lipit peroksidasyonuna benzer şekilde serbest radikal zincir reaksiyonları şeklinde gelişmektedir. Protein oksidasyonu, reaktif oksijen radikalleri ile direkt olarak veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu indirek olarak indüklenen, proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır. Protein oksidasyonu için genel bir belirteç yoktur. Ancak, protein karbonil grupları oksidatif nedenli hücre hasarının en genel belirteci olarak kabul edilmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır (198).

Yapılan diğer çalışmalarda fazla raslayamadığımız PC düzeyi, yaptığımız bu çalışmada yalnızca metilprednizolon verilen grupta kontrol grubuna kıyasla azalmış olarak bulunmuştur. Bu da kortikosteroidlerin protein oksidasyonu üzerine koruyucu etkisi olduğunu düşündürmektedir. Muhtemeldir ki tekrarlayan dozlarda steroid kullanılarak yapılacak daha uzun süreli çalışmalarda istatistiksel olarak da anlamlı sonuçlar elde edilebilecektir.

Kelly ve ark. steroidlerin neden olduğu hipertansiyona NO sentezinin bozulması ve damarların tonusunun değişmesinin neden olduğunu öne sürdüler (63). Çünkü: 1) hipertansiyon fonksiyonel olarak periferik vasküler direncin artmasıyla ilintilidir. 2) eNOS'ın inhibisyonu kan basıncını artırır (199). 3) e-NOS olmayan farelerin hipertansif olduğu anlaşılmıştır (200).

Schafer ve ark. yaptıkları bir çalışmada; 0.1 ve 3 mg/kg dozunda deksametazon iki hafta süreyle farelere verilmiş, deksametazon farelerin kalbinde eNOS mRNA seviyesini ve serum  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  seviyelerini baskılamış ve aynı zamanda eNOS proteinini % 85.6 azaltmış. Deksametazonun baskıladığı vazodilatasyon L-arjinin ve vitamin C diyetiyle kısmen düzelmiş. Deksametazonun mikrovasküler vazodilatasyonu baskılaması; eNOS'u azaltması ve reaktif oksijen türleri üretmesi nedeniyle olduğu sonucuna ulaşmışlardır (12).

Poliandri ve ark. yaptıkları çalışmada NO oksidatif stresi azaltarak hücre ölümünden koruyabileceği sonucuna ulaşmışlardır (201). Diğer taraftan NO nitrojen dioksit ve peroksinitrit gibi sitotoksik bileşikler üretir (202).

Çalışmamızda; NO düzeyinde yalnızca metilprednizolon grubunda, kontrol grubuna kıyasla farklılık yoktu. Halbuki yukarıdaki çalışmalarda steroidlerin NO

düzeşini azaltarak hipertansiyona neden olduğu belirtilmiştir. Bizim alışmamızda NO düzeyini değişmemiş olarak bulmamız tek seferde uygulanan steroidin böyle bir etkisinin olmadığını göstermektedir. NO düzeyini azaltıcı etkisi muhtemelen uzun süreli kullanımlarda ortaya çıkabilmektedir.

Oksijen, süperoksit radikaline ( $O_2$ ) bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit iyonu, SOD aracılığıyla  $H_2O_2$  ve  $O_2$ 'ye çevrilir. Süperoksit radikalinden daha zayıf etkili olan  $H_2O_2$ , dokularda bulunan CAT, peroksidaz ve GSH-Px gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale getirilir (203).

Yaptığımız bu çalışmada; kalp dokusunda SOD düzeyinde metilprednizolon verilen grupta kontrol grubuna kıyasla farklılık yoktu, GSH-Px düzeyini yine kontrol grubuna kıyasla minimal yüksek bulduk, ancak her iki değer için de istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık yoktu. Bu sonuç, tek seferde verilen glukokortikoidin kalp dokusunda SOD ve GSH-Px enzimlerinin aktivitesini etkilemediğini göstermektedir.

Çalışmamızda doku CAT düzeyini yalnız metilprednizolon verilen grupta kontrol grubuna kıyasla istatikselsel olarak anlamlı olmasa da yüksek olarak bulduk. Bu sonuç steroidlerin bu şekilde tek seferde yüksek dozda kullanımlarının CAT enzimi üzerine olumlu etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Koroner kalp hastalığı olan bireylerde normal bireylere göre melatonin seviyesi düşük bulunmuştur (106). Ani kardiyak ölüm insidansı sabah saatlerinde yüksek iken bu saatlerde melatonin seviyesi anlamlı bir şekilde düşüktür (107). Yaşlanma ile kalp hastalıkları insidansı artarken melatonin seviyesi azalmaktadır (108). Tüm bunlar melatoninin kalp hastalıklarının patofizyolojisinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Melatonin yüksek antioksidan kapasiteye sahip bir hormondur (17). Epifiz bezinin baş sekresyon ürünü olan melatonin direkt radikal süpürücü özelliktedir ve indirek antioksidan özellik gösteririr (18-21). Yan etkilerinin az olması ve ucuz olması nedeniyle insanlarda kullanım potansiyeli yüksektir (22). Çok fazla toksik etkileri olan OH ile etkileşir ve hidrojen peroksiti, peroksinitrit anyonunu, NO'i ve hipokloröz asidi ntralizeler. Süperoksit dismutaz (SOD), GSH, CAT glutatyon

redüktaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan sistem enzimlerinin sentezini arttırır (113,114).

Melatonin hücre içi önemli bir antioksidan olan glutatyon (GSH) sentezini uyarır (115), nitrik oksit (NO) sentezini ise inhibe eder. Melatonin bir yandan antioksidan enzimlerin etkinliklerini arttırırken diğer yandan antioksidan enzimleri oksidatif stresten de korur. Mitokondrideki elektron transport zincirinden elektron sızıntısını önler ve serbest radikal üretimini azaltır. Melatonin hücre membranını oksidatif durumlara karşı daha dayanıklı hale getirirken nükleer DNA'yı da oksidatif hasardan korur (89,116,117).

Direk serbest radikal giderici ve indirek olarak antioksidan enzimleri stümüle eden melatoninin keşfi onun potansiyel kardiyoprotektif etkilerine ilgiyi artırmıştır (23). Kalp kan akımı tehlikeye girdiğinde melatoninin kalpte yararlı etkileri gösterilmiştir (24). Doksorubisin gibi kardiyotoksik ilaçların toksisitesini sınırladığı ve moleküler hasarı azalttığı gösterilmiştir (25-27).

Oksidatif strese karşı faydalı etkileri karaciğer sirozu (28) ve akut pankratitte (29) gösterilmiştir. Melatoninin ventriküler fonksiyonu üzerine faydalı bir etkisi olan antihipertansif özelliği gösterilmiştir (124). Melatoninin, birçok farklı doku iskemi/reperfüzyon (İ/R) modellerinde serbest radikal süpürücü etkiye sahip olduğu, gösterilmiştir (125-127).

Melatoninin karaciğer ve böbrekte antioksidan enzimlere etkisini inceleyen bir çalışmada 10 mg/kg'dan melatonin erişkin dişi ratlara verilmiş. Sonuçta karaciğerde SOD ve GSH-Px aktivitesi anlamlı şekilde artmış, böbrek dokusunda CAT, GSH-R, GSH-Px ve GSH düzeyi artarken SOD ve lipid peroksidasyonu (MDA) değişmemiş (204).

Melatoninin hepatoprotektif özellikleri deneysel kolestazis de gösterilmiştir (205). Cruz ve ark.'nın ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, deneysel tıkaçıcı sarılık yapılmış ve melatonin intraperitoneal olarak 500 µg/kg/gün dozunda verilmiş ve kalp dokusunda MDA, redükte glutatyon (GSH), katalaz (CAT), SOD, ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) antioksidan enzimlerinin seviyeleri ölçülmüş. Obstruktif kolestazis MDA'yı artırmış, GSH ve antioksidan enzimleri azaltmış. Melatonin verilmesi anlamlı olarak MDA değerlerini azaltmış ve GSH ve antioksidan enzimleri sarılıklı hayvanın miyokardında artırmış. Melatonin tedavisi

deneysel kolestazisin indüklediği kalp dokusundaki oksidatif stresi önler sonucuna ulaşılmış (206).

Erdem ve ark. yaptıkları bir çalışmada: akut iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı oluşturulan sıçanların iskelet kasları üzerine melatoninin antioksidan koruyucu etkisi araştırılmış, iskemi/reperfüzyon grubunun kas doku örneklerinde antioksidan enzim (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz) aktiviteleri, malondialdehit, nitrik oksit düzeyleri ve protein karbonil içeriği kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş, kas dokusundaki bu parametre seviyeleri karşılaştırıldığında, İ/R + melatonin grubunda, İ/R grubuna göre belirgin azalmalar tespit edilmiş, iskemik kasların histopatolojik incelemesinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında, İ/R grubunda belirgin bir dejenerasyon ve inflamasyon gözlenmiş, oysa, İ/R grubu ile karşılaştırıldığında, melatonin verilen iskemik kaslarda dejenerasyon ve inflamasyonda önemli bir azalma gözlenmiş, sonuç olarak iskelet kası akut İ/R hasarı modelinde; melatoninin, iskelet kası reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi vurgulanmıştır (207).

Yaptığımız bu çalışmada metilprednizolonla beraber melatonin verilen grupta, yalnızca metilprednizolon verilen gruba kıyasla doku MDA düzeyini azalmış olarak bulduk. Bu sonuç yukarıdaki diğer çalışma sonuçlarıyla paralellik arzetmekte ve melatoninin diğer çalışmalarda gösterilen antioksidan etkisini desteklemekte, lipid peroksidasyonu üzerine melatoninin koruyucu etkisini göstermektedir.

Çalışmamızda doku PC düzeyini melatonin verilen grupta yalnızca metilprednizolon verilen gruba kıyasla azalmış, kontrol grubuna kıyasla da istatistiksel olarak da anlamlı derecede azalmış olarak bulduk. Bu sonuç melatoninin protein oksidasyonu üzerine koruyucu etkisini göstermektedir.

Çalışmamızda melatonin grubunda NO düzeyini diğer iki gruba kıyasla düşük bulduk. Nitrojen dioksit ve peroksinitrit gibi zararlı bileşiklere dönüşerek zararlı bir molekül haline gelen NO düzeyini azaltması yine melatoninin antioksidan özelliğini desteklemekte ve sonucumuz yukarıdaki diğer çalışmalarla paralellik arzetmektedir.

Çalışmamızda melatonin grubunda SOD düzeyini diğer gruplarla kıyasladığımızda farklılık bulamadık. GSH-Px ve CAT düzeyini ise melatonin grubunda diğer iki gruba kıyasla artmış olarak bulduk. Bu sonuçlar da melatoninin antioksidan enzimler üzerine indükleyici etkisini göstermekte ve melatoninin hem

oksidan molekülleri azaltarak hem de antioksidan enzimleri artırarak güçlü bir antioksidan özellik gösterdiğini desteklemektedir.



## 6. SONUÇ

Çalışmamızın sonuçları metilprednizolon uygulamasının, lipid peroksidasyon göstergesi olan MDA düzeyini artırdığı, protein oksidasyon göstergesi olan PC düzeyini ise azalttığını ve NO düzeyini değiştirmedğini göstermektedir. Metilprednizolon uygulaması sonrası tavşan kalp dokusunda SOD enzim düzeyinde değişiklik görülmemiş, GSH-Px enzim düzeyinde yükselme, katalaz enzim düzeyinde ise artış saptanmıştır. Metilprednizolonla beraber melatoninin uygulamasının MDA düzeyinin yalnız metilprednizolon grubuna göre azalttığı, PC düzeyini ve NO düzeyini azalttığını göstermektedir. Metilprednizolon ve melatonin birlikte uygulaması sonrası tavşan kalp dokusunda SOD enzim düzeyinde değişiklik görülmemiş, GSH-Px enzim düzeyinde ve katalaz enzim düzeyinde ise artış saptanmıştır.

Bu sonuçlara göre metilprednizolonun çalışma dozlarımızda, lipidler üzerine oksidan etkileri olduğu, metilprednizolon ve melatoninin proteinler üzerine antioksidan etkileri olduğunu söyleyebiliriz. Metilprednizolonun oksidan ve antioksidan olarak farklı etki dozlarının belirlenmesinde, etki mekanizmalarının anlaşılmasında ileri hayvan ve insan çalışmalarının yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

## 7. KAYNAKLAR

1. Le YY, Xu RB: The molecular mechanism of the action of the pharmacological doses of glucocorticoids: Studies on the low affinity glucocorticoid receptor. *Receptor* 5: 63–69, 1995
2. Whitworth JA: Studies on the mechanisms of glucocorticoid hypertension in humans. *Blood Press*. 1994;3:24–32.
3. Saruta T. Mechanism of glucocorticoid-induced hypertension. *Hypertens Res*. 1996;19:1–8.
4. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21:55–89
5. Bjelakovic G, Stojanovic I, Stoimenov TJ, Pavlovic D, Kocic G, Rossi S, Tabolacci C, Nikolic J, Sokolovic D, Bjelakovic L (2010) Metabolic correlations of glucocorticoids and polyamines in inflammation and apoptosis. *Amino Acids* 39:29–43
6. Romero LM, Wikelski M (2001) Corticosterone levels predict survival probabilities of Galapagos marine iguanas during ElNiño events. *Proc Nat Acad Sci USA* 98:7366–7370
7. Agostinho P, Cunha RA, Oliveira C (2010) Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Design* 16:2766–2778.
8. Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, Chapple S, Cohen G, Feher J, Grune T, Lengyel G, Mann GE, Pamplona R, Poli G, Portero-Otin M, Riahi Y, Salvayre R, Sasson S, Serrano J, Shamni O, Siems W, Siow RCM, Wiswedel I, Zarkovic K, Zarkovic N (2010) Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Rad Res* 44:1125–1171.
9. Nishigori H, Lee JW, Yamauchi Y, Iwatsuru M: Elevation of blood lipid peroxides [(TBA-reacting substance)] level in developing chick embryo after glucocorticoid administration. *Biochem Int* 13: 147–183, 1986.
10. Randhawa PS, Hass MA, Frank L, Massaro D: PO<sub>2</sub> –dexamethasone interactions in fibroblast growth and antioxidant enzyme activity. *Am J Physiol* 252: C396–C400, 1987

11. Asayama K, Hayashibe H, Dobashi K, Uchida N, Kato K: Effect of dexamethasone on antioxidant enzymes in fetal rat lungs and kidneys. *Biol Neonate* 62: 136–144, 1992
12. Schafer SC, Wallerath T, Closs EI, Schmidt C, Schwarz PM, et al. (2005) Dexamethasone suppresses eNOS and CAT-1 and induces oxidative stress in mouse resistance arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H436–444.
13. Rajashree S, Puvanakrishnan R (1998) Dexamethasone induced alterations in enzymatic and nonenzymatic antioxidant status in heart and kidney of rats. *Mol Cell Biochem* 181: 77-85.
14. Whitworth JA, Schyvens CG, Zhang Y, Andrews MC, Mangos GJ, et al. (2002) The nitric oxide system in glucocorticoid-induced hypertension. *J Hypertens* 20:1035–1043.
15. Iuchi T, Akaike M, Mitsui T, Ohshima Y, Shintani Y, et al. (2003) Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 92: 81–87.
16. Zhang Y, Croft KD, Mori TA, Schyvens CG, McKenzie KU, et al. (2004) The antioxidant tempol prevents and partially reverses dexamethasone-induced hypertension in the rat. *Am J Hypertens* 17: 260–265.
17. Reiter RJ, Tan Dx, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z: Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol* 2007; 54: 1-9.
18. Cabeza J, Motilva V, Martín M, J and De La Lastra C. A: “Mechanisms involved in gastric protection of melatonin against oxidant stress by ischemia-reperfusion in rats,” *Life Sciences*, vol. 68, no. 12, pp. 1405–1415, 2001.
19. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ: Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J*, 1993, 1, 57–60.
20. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E: Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. *J Biomed Sci*, 2000, 7, 444–458.
21. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RJ, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ: Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, 2004, 36, 1–9.

22. Reiter RJ: Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol*, 1998, 56, 359–384.
23. Tengattini S, Reiter RJ, Tan DX, Terron P, Rodella LF, Rezani R. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J Pineal Res* 2008; 44: 16-25.
24. Reiter RJ, Tan DX: Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemia/reperfused heart. *Cardiovasc Res*, 2003, 58, 10–19.
25. Dziegel P, Cialowicz EM, Jethon Z, Januszewska L, Okalow MP, Surowiak P, Zawadzki M et al.: Melatonin stimulates the activity of protective antioxidative enzymes in myocardial cells of rats in the course of doxorubicin intoxication. *J Pineal Res*, 2003, 35, 183–187.
26. Reiter RJ, Tan DX, Sainz RM, Mayo JC: Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *J Pharm Pharmacol*, 2002, 54, 1299–1321.
27. Sahna E, Parlakpinar H, Ozer MK, Ozturk F, Ozugurlu F, Acet A: Melatonin protects against myocardial doxorubicin toxicity in rats: role of physiological concentrations. *J Pineal Res*, 2003, 35, 257–261.
28. Cruz A, Padillo FJ, Torres E, Navarrete CM, Munoz-Castaneda JR, Caballero FJ, et al. Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. *J Pineal Res* 2005; 39: 143-50.
29. Munoz-Casares FC, Padillo FJ, Briceno J, Collado JA, Munoz-Castaneda JR, Ortega R, et al. Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *J Pineal Res* 2006; 40: 195-203.
30. Simko P, Paulis L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment. *J Pineal Res* 2007; 42: 319-22.
31. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi 2. Cilt. 4. Baskı*, Ankara, Günes Kitabevi. 2006; 1–14.
32. Standring S. *Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice*. Gatzoulis M.A. 40. Baskı, Londra. Churchill Livingstone Elsevier. 2008; 959–974, 978–981)
33. *İnsan Anatomisi Atlası-Netter* (2006).
34. Sadler T. W. *Langman's Medical Embryology*. 10. Baskı. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Philadelphia. 2006; 159–194.

35. Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. 3. Baskı, Ankara, Tıp & Teknik Yayıncılık. 1998; 381–397, 416–427.
36. Müftüoğlu S, Pergin A, Kaymaz F. Çeviri editörü, 7. Baskı. Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri, Günes Tıp Kitabevleri, Ankara. 2009; 46–48, 191–224.
37. Yıldırım M. İnsan Anatomisi, İstanbul, Beta Basım Yayım Dağıtım, 1994:97.
38. Sağlam M. Genel histoloji. Genişletilmiş 4. Baskı. 1993: 243-246.
39. Kim E. Barrett. Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi Nobel tıp kitabevleri. 23. Baskı 492 sf.
40. Nemeroff CB, New vistas in neuropeptide research in neuropsychiatry: focus on corticotropin-releasing factor. *Neuropsychopharmacology*, 6:69-75, (1992).
41. Girod JP, Brotman DJ: Does altered glucocorticoid homeostasis increase cardiovascular risk? *Cardiovascular Research*. 64, 217-226, (2004).
42. Whitworth JA, Williamson PM, Mangos G, Kelly JJ, Cardiovascular consequences of cortisol excess. *Vascular Health and Risk Management*, 1: 4, 291-299, (2005).
43. Gravanis A, Margioris AN. Pharmacology of glucocorticoids: an overview. In: Margioris AN, Chrousos gp (eds). *Adrenal Disorders*. Humana Pres. 2001: 59-70.
44. Erdoğan G. Adrenal korteks. Sellahattin Koloğlu(ed). *Endokrinoloji ve Temel Klinik*. Medical Network. 1996:533-73.
45. Kaplan MN. The adrenal glands. In: Griffin JE, Ojeda SR (eds). *Textbook of Endocrine Physiology* (4th ed). 2000: 328-356.
46. Vivian HTJ. Adrenal Cortex Physiology. In: *Clinical Endocrinology* (2nd ed). Wolf. 1994: 2-12.
47. Keller-Wood ME, Dalman MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrine rev*. 1984; 5:1-24.
48. Kayaalp SO: Kortikosteroid antagonistleri ve ACTH. *Tıbbi Farmakoloji* (10. baskı).
49. Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ (1984) Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 5:25–44

50. Romero LM, Dickens MJ, Cyr NE (2009) The reactive scope model—a new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Horm Behav* 55:375–389
51. Dardevet D, Sornet C, Taillandier D, Savary I, Attaix D, and Grizard J. 1995: Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. *J. Clin. Invest.* 96, 2113–2119.
52. Yeh JY, Ou BR, and Forsberg NE, 1994: Effects of dexamethasone on muscle protein homeostasis and on calpain and calpastatin activities and gene expression in rabbits. *J. Endocrinol.* 141, 209–217.
53. Butcher DL, Sahn SA, Epidural lipmatosis a complication of corticosteroid therapy. *Ann intern Med* 1979; 90:60-63.
54. Enc Y, Karaca P, Ayoglu U, Camur G, Kurc E, Cicek S. The acute cardioprotective effect of glucocorticoid in myocardial ischemia-reperfusion injury occurring during cardiopulmonary bypass. *Heart Vessels* 2006;21:1526.
55. Chimalakonda AP, Mehvar R. Effects of methylprednisolone and its liver-targeted dextran prodrug on ischemia-reperfusion injury in a rat liver transplantation model. *Pharm Res* 2007;24:22318.
56. Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 1993;119:1198-208.
57. Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braughler JM, Hall ED, et al. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Cent Nerv Syst Trauma* 1985;2:257-67.
58. Anderson DK, Dugan LL, Means ED, Horrocks LA. Methylprednisolone and membrane properties of primary cultures of mouse spinal cord. *Brain Res* 1994 21;637:119-25.
59. Rashid S, Lewis GF. The mechanisms of differential glucocorticoid and mineralocorticoid action in the brain and peripheral tissues. *Clin Biochem.* 2005;38:401-9.
60. Franchin G, Diamond B. pulse steroids: how much is enough? *Autoimmune rev* 2006;5 :111-3.

61. Wollheim FA. Acute and long term complication of corticosteroid pulse therapy. *Scand J Rheumatol* 1984; 54: 27-32.
62. Ross EJ, Lynch DC. Cushing's syndrome-killing disease: discriminatory value of signs and symptoms aiding early diagnosis. *Lancet*. 1982;2:646–649.
63. Kelly JJ, Mangos G, Williamson PM, and Whitworth JA. Cortisol and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 25: S51–S56, 1998.
64. Whitworth JA, Gordon D, Andrews J, Scoggins BA The hypertensive effect of synthetic glucocorticoids in man: role of sodium and volume. *J Hypertens*. 1989;7:537–549.
65. Wallerath T, Witte K, Schaefer SC, Schwarz PM, Prellwitz W, Wohlfart P, Kleinert H, Lehr HA, Lemmer B, and Foerstermann U. Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13357–13362, 1999.
66. Becker DM: Relationship between corticosteroid exposure and plasma lipid levels in heart transplant recipients. *Am J Med* 1988; 85: 632-634.
67. Nashel DJ: Is atherosclerosis a complication of long term corticosteroid therapy? *Am J Med* 1986; 80: 925-929.
68. Czerwinski SM, Kurowski TT, Mckee EE, Zak R, Hickson RC: Myosin heavy chain turnover during cardiac mass changes by glucocorticoids. *J Appl Physiol* 70: 300–305, 1991.
69. Smith SH, Kramer MF, Reis I, Bishop SP, Ingwall JS: Regional changes in CK and myocyte size in hypertensive and non hypertensive cardiac hypertrophy. *Circ Res* 67: 1334–1344, 1990
70. Ueda N, Yoshikawa T, Chihara M, Kawaguchi S, Niinomi Y, Yasaki T: Atrial fibrillation following methylprednisolone pulse therapy. *Pediatric Nephrol* 1988; 2:29-31.
71. Garrett R, Paulus H. Complication of intravenous methylprednisolone pulse therapy. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 67.
72. Thompson JF, Chalmers DHK, Wood BFM, Kirkham SR, Morris PJ: Sudden death following methylprednisolone pulse therapy. *Transplant Proc* 1983;36(5):594-595.

73. Akikusa JD, Feldman BM, Gross GJ, Silverman Ed, Schneider R. Sinus bradycardia after intravenous pulse methylprednisolone. *Pediatrics*. 2007; 119(3):e778-82Epub 2007 feb16.
74. Bocanegra TS, Casteneda MO, Espinoza LR, Vasey FB, Germain BF. Sudden death after Methylprdnisolone pulse therapy. *Ann Intern Med* 1982;95(1):122.
75. Husum B, Palm T, Andersen K, Vellsted H: Immediate hemodynamic effect of pharmacological doses of methylprednisolone in dogs, and the influence of speed of injection. *Acta Anesth Scand* 1980;20:61-64.
76. Nittoh T, Fujimori H, Kozumi Y, Ishihara K, Mue S, and Obuchi K. 1998: Effects of glucocorticoids on apoptosis of infiltrated eosinophils and neutrophils in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 354, 73–81.
77. Kirsch AH, Mahmood AA, Enders J, Bohra L, Bonish B, Weber K. et al., 1999: Apoptosis of human T-cells: induction by glucocorticoids or surface receptor ligation in vitro and ex vivo. *J. Biol. Reg. Homeost. Agents* 13, 80–89.
78. Landfield PW and Eldridge JC, 1994: The glucocorticoid hypothesis of age-related hippocampal neurodegeneration: role of dysregulated intraneuronal calcium. *Ann. NY Acad. Sci.* 746, 308–321.
79. Baker AF, Briehl MM, Dorr R, and Powis P. 1996: Decreased antioxidant defence and increased oxidant stress during dexamethasone- induced apoptosis: bcl-2 prevents the loss of antioxidant enzyme activity. *Cell Death Diff.* 3, 207–213.
80. Kalimi M, Shafagoj Y, Loria R, Padgett D, and Regelson W. 1994: Anti-glucocorticoid effects of dihydroepiandrosterone (DHEA). *Mol. Cell. Biochem.* 131, 99–104.
81. Sainz RM, Mayo JC, Reiter RJ, Antolin I, Esteban MM, and Rodriguez C. 1999: Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus. *FASEB J.* 13, 1547–1556.
82. Briehl MM and Baker AF. 1996: Modulation of the antioxidant defence as a factor in apoptosis. *Cell Death Diff.* 3, 63–70.
83. Meagher LC, Cousin JM, Seckl JR, and Haslett C. 1996: Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J. Immunol.* 156, 4422–4428



84. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman LM and Korsmeyer SJ. 1993: Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241–251
85. McIntosh LJ, Sapolsky RM (1996) Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. *Exp Neurol* 141: 201–206.
86. McIntosh LJ, Hong KE, Sapolsky RM (1998) Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain Res* 791: 209–214.
87. Ahlbom E, Gogvadze V, Chen M, Celsi G, Ceccatelli S (2000) Prenatal exposure to high levels of glucocorticoids increases the susceptibility of cerebellar granule cells to oxidative stress-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14726–14730.
88. Behl C, Lezoualc'h F, Trapp T, Widmann M, Skutella T, et al. (1997) Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons in vitro. *Endocrinology* 138: 101–106.
89. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnecki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 1129-1146.
90. Reiter RJ: Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*, 1991, 12, 151–180.
91. Huether G: The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia*, 1993, 49, 665–670.
92. Bubenik GA: Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Digest Dis Sci*, 2002, 47, 2336–2348.
93. Stefulj I, Hörtnner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wölfer A, Semmler J et al.: Gene expression of key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res*, 2001, 30, 243–247.
94. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ: Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res*, 2003, 34, 75–78.
95. Kilic E, Hermann DM, Isemann S, Böhr M: Effects of pinealectomy and melatonin on the retrograde degeneration of retinal ganglion cells in a novel model of intraorbital optic nerve transection in mice. *J Pineal Res*, 2002; 32, 106–111.

96. Kilic E, Özdemir YG, Bolay H: Pinealectomy aggravates and melatonin administration attenuates brain damage in focal ischemia. *J Cerebr Blood Flow Metab*, 1999, 19, 511–516.
97. Vanecek J. (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 78: 687-721.
98. Grivas TB, Savvidou OD. Melatonin the "light of night" in human biology and adolescent idiopathic scoliosis. *Scoliosis* 2007; 2: 6.
99. Cardinali DP, Borfman GP, Liotta G, Perez Floret S, Albornoz LE, Cutrera RA, Batista J et al.: A multifactorial approach employing melatonin to accelerate resynchronization of sleep-wake cycle after a 12 timezone westerly transmeridian flight in elite soccer athletes. *J Pineal Res*, 2002, 32, 41–46.
100. Cardinali DP: Clinical perspectives for the use of melatonin as a neuroprotective chronobiotic in Alzheimer's disease. *Aktual Neurol*, 2003, 3, 188–204.
101. Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT: Melatonin as a chronobiotic/ anticancer agent. *Curr Top Med Chem*, 2002,2, 113–132.
102. Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJ: Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuroendocrinol Lett*, 2001, 22, 45–47.
103. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004;36:1-9.
104. Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 2003;34:1-10.
105. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003;17:273-85.
106. Brugger P, Marktl W, Herold M. Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease. *Lancet* 1995; 345: 1408.
107. Muller JE, Ludmer PL, Willich SN, Tofler GH, Aylmer G, Klangos I, et al. Circadian variation in the frequency of sudden cardiac death. *Circulation* 1987; 75: 131-8.

108. Reiter RJ. The aging pineal and its physiological consequences. *BioEssays* 1992; 14: 169-75.
109. Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, Cordaro S et al.: Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res*, 2001, 50, 756–760.
110. Gitto E, Reiter RJ, Amodio A, Romero C, Cuzzocrea E, Sabatino G, Buonocore G et al.: Early indicators of chronic lung disease in preterm infants with respiratory distress syndrome and their inhibition by melatonin. *J Pineal Res*, 2004, 36, 250–255.
111. Gitto E, Reiter RJ, Cordaro SP, La Rosa, M, Chiurazzi, P, Trimarchi G, Gitto P et al.: Oxidative and inflammatory parameters in respiratory distress syndrome of preterm newborns: beneficial effects of melatonin. *Am J Perinatol*, 2004, in press.
112. Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Tan DX, Gitto P, Barberi S, Barberi I: Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period. *Biol Neonate*, 2002, 81,146–157.
113. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *Journal of Biomedical Science* 2000; 7: 444-58.
114. Menendez-Pelaez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow- Walden L, Pablos MI and Tan DX, “Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues. Immunological and radioimmunoassay evidence,” *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 53, no. 4, pp. 373–382, 1993.
115. Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Ueda T, Cho S, Honma K et al.: Melatonin induces glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 1999, 838–847.
116. Acuna CD, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 133-151.
117. Subramanian P, Mirunalini S, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Melatonin treatment improves the antioxidant status and decreases lipid content in brain and liver of rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 571: 116-119.
118. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept.* 2000 May-Aug;9(3-4):137-59.

119. Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, Karbownik M, Manchester LC, Cuzzocrea S, Fulia F et al.: Individual and synergistic actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione, and desferoxamine in liver homogenates. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53, 1393–1401.
120. Lopez-Burillo S, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Manchester LC, Reiter RJ: Melatonin, xanthurenic acid, resveratrol, EGCG, vitamin C and  $\alpha$ -lipoic acid differentially reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions. *J Pineal Res*, 2003, 34, 269–277.
121. Lopez-Burillo S, Tan DX, Rodriguez-Gallego V, Manchester LC, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ: Melatonin and its derivatives cyclic 3-hydroxymelatonin, N<sup>1</sup>-acetyl- N<sup>2</sup>-formyl-5-methoxykynuramine and 6-methoxymelatonin reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents. *J Pineal Res*, 2003, 34, 178–184.
122. Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ, Valdinia-Velazquez M, Martinez-Barboza G, Acosta-Martinez JP, Ortiz GG: Orally administered melatonin reduces oxidative stress and proinflammatory cytokines induced by amyloid-  $\beta$ -peptide in rat brain: a comparative, in vivo study versus vitamin C and E. *J Pineal Res*, 2003, 35, 80–84.
123. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC et al.: Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*, 2002, 2, 181–198.
124. Simko P, Paulis L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment. *J Pineal Res* 2007; 42: 319-22.
125. Lagneux C, Joyeux M, Demenge P, Ribuot C, Godin-Ribuot D. Protective effects of melatonin against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Life Sci* 2000;66:503-9.
126. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Enzan H, Miyahara Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol* 2003;469:145-52.
127. Sener G, Sehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yeğen BC. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Pineal Res* 2002;32:120-6.

128. Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Acuña- Castroviejo D: Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J*, 2000, 14, 1677–1679.
129. Halliwell B: Oxidants and human disease: Some new concepts. *FASEB J* 1: 358–364, 1987
130. Emerit I, Packer L: *Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine*. Plenum, New York, 1990
131. Shah SV, Baricos WH, Basci A: Degradation of human glomerular basement membrane by stimulated neutrophils: Activation of a metallo proteinase/s by reactive oxygen metabolites. *J Clin Invest*: 79: 25–31, 1987.
132. Guo X, Sun Y, and Sun G, “Effect of fluoride on activities of enzymes and ultrastructure in primary cultured rat hepatocytes,” *Weisheng Yanjiu*, vol. 34, pp. 35–37, 2005 (Chinese).
133. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper’s Biochemistry*. 25 ed. New York: McGraw-Hill; 2000.
134. Dündar Y, Aslan R, (1999) Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller-antioksidanlar. *Cerrahi Tıp Bilimleri Dergisi İnsizyon* 2 (2),134-142.
135. McCord JM. Human disease free radicals and oxidant balance *Clin Biochem* 1993; 26, 351-57.
136. Cavdar C, Sifil A, Camsarı T. Reactive oxygen particles and antioxidant defence. *Office Journal of the Turkish Nephrology, Association* 1997; 3-4: 92-5.
137. Chung HY, Kim HJ, Shim KH ve ark. Dietary modulation of prostanoid synthesis in the Aging process: role of cyclooxygenase-2. *Mech Ageing Dev* 1999; 111: 97-106.
138. Freeman BA, Crapo JD. *Biology of disease: free radicals and tissue injury*. *Lab Invest* 1982; 47: 412-26.
139. Lankin VZ. The enzymatic systems in the regulation of free radical lipid peroxidation. *Free radicals, Nitric Oxide and Inflammation: Molecular, biochemical and clinical aspects*. *Nato Science Series*. 2003;344:8-23.
140. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, 1999.

141. Montgomery R, Dryer R, Conway T, Specter A, (Eds) *Biyokimya*, (2000) (Çeviri Edt. Altan N.) 6 th. Ankara Palme Yayınevi, SS 68-94.
142. Meram İ, Aktaran Ş. Serbest Radikallerin Biomoleküller Üzerine Etkileri. *Ç.Ü. Dergisi* 2002; 3: 299-304.
143. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 207-18.
144. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995;41:1819-1828.
145. Slater FT. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 1984;105:283-293.
146. Aust SD: Lipid peroxidation. In: RA Greenwald (ed). *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, 1985, pp 203–207.
147. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol* 1996; 46: 15- 32.
148. Van Bebber IPT, Boekholz WKF, Goris RJA et al. Neutrophil function and lipid peroxidation in a rat model of multiple organ failure. *J Surg Res*, 1989; 47: 471-5.
149. Bo SH, Davidsen EM, Gulbrandsen P et al. Cerebrospinal fluid cytokine levels in migraine, tension-type headache and cervicogenic headache. *Cephalalgia* 2009; 29 (3): 365-72.
150. Totan Y, Cekic O, Borazan M, Uz E, Sogut S, Akyol O: Plasma malondialdehyde and nitric oxide levels in age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* . 2001;85:1426–1428.
151. Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H: Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123 occurs in early stages of endotoxic and haemorrhagic shock and ischemia-reperfusion injury. *FEBS Lett.* 1995;372:229–232.
152. Kirkeboen KA, Strand QA: The role of nitric oxide in sepsis—an overview. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1999;43:275–288.
153. Beckman JS, Ischiropoulos H, Zhu L, van der Woerd M, Smith C, Chen J, Harrison J, Martin JC, Tsai M: Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalysed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 1992;298: 438-445.
154. Moellering D, McAndrew J, Patel RP, Cornwell T, Lincoln T, Cao X, Messina J, Forman HJ, Darley-Usmar VM: Nitric Oxide dependent induction of glutathione

- synthesis through increased activity of c-glutamylcysteine synthetase. *Arch Biochem Biophys.* 1998;358: 74-82.
155. Mayer B, Hemmens B: Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells, *Trends Biochem Sci.* 1997;22:477-481
156. Schulz R, Wambolt R. Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 432-9.
157. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 1994;97:5S-13S.
158. Reiter RJ, Tan DX, Gitto E. et al., "Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage," *Polish Journal of Pharmacology*, vol. 56, no. 2, pp.159–170, 2004.
159. Beckman JS, Freeman BA: Antioxidant enzymes as mechanistic probes of oxygen dependent toxicity. In: AE Taylor, S Matalon, P Ward (eds). *Physiology of Oxygen Radicals*. American Physiological Society, Bethesda, 1986, 39–53.
160. Halliwell B Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 1341-8.
161. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelisim* 1998; 11: 342 -346.
162. Fujita T. (Formation and removal of reactive oxygen species, lipid peroxides and free radicals, and their biochemical effects.) *Yakugaku Zasshi.* 2003;122:203–218.
163. Deneke SM and Fanburg BL, "Regulation of cellular glutathione," *American Journal of Physiology*, vol. 257, no. 4, pp. L163–L173, 1989.
164. Clahsen PC, Moison RM, Holtzer CA and Berger HM, 1992: Recycling of glutathione during oxidative stress in erythrocytes of the newborn. *Pediatr. Res.* 32, 399–402.
165. Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg Jr P, Reed RL et al., 1998: Glutathione in human plasma: decline in association with ageing, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Rad. Biol. Med.* 24, 699–704.
166. Burton GW (1994) Vitamin E: molecular and biological function. *Proc Nutr Soc* 53: 251–262.

167. Valko M, Leibfritz D, Monocol J, Corinin M and Mazur M. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39 44-84.
168. Hamed SA, Nabeshima T. The high atherosclerotic risk among epileptics: the atheroprotective role of multivitamins. *J Pharmacol Sci.* 2005;98:340–353.
169. Frei B, England L, Ames BN (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6377–6381.
170. Niki E, Kawakami A, Yamamoto Y, Kamiya Y. (1985) Oxidation of lipids. VIII. Synergistic inhibition of oxidation of vitamin E and vitamin C. *Bull Chem Soc Japan* 58,1971-78.
171. Tanaka K, Hashimoto T, Tokumaru S, Iguchi H, Kojo S. (1997) Interactions between vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. *J Nutr* 127 (10),2060-4.
172. Niki E. (1991) Vitamin C as an antioxidant. *World Rev Nutr Diet* 64, 3-30
173. Akkuş İ.(1995). Klinik biyokimya laboratuvarı el kitabı. Akkuş Öz Eğitim Bas. Yay. Dağ. Konya 1-354.
174. Sun Y, Oberley LW, Ying L, (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*: 34:497-500
175. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951): Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*; 193:265-275
176. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Methods in Enzymology*, V 186, Oxygen radicals in biological systems edited by Packer L, Glazer AN. Academic Press, California, 1990, pp 407-421
177. Mueller AR, Platz KP, Langrehr JM, Hoffman RA, Nussler AK, Nalesnik M, Billiar TR, Schraut WH. (1994). The effects of administration of nitric oxide inhibitors during small bowel preservation and reperfusion. *Transplantation*: 58:1309-16.
178. Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, Chopp M. (1993). Nitric oxide measured by porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 13(3):355:358.



179. Cortas NK, Wakid N. (1990). Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*; 36:1440-3 .
180. Durak I, Yurtarslani Z, Canbolat O, Akyol O. (1993). A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta*; 214:103-104.
181. Paglia DE, Valentine WN (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab & Clin Med*; 70:158-169.
182. Scaccini C, Chinesa GJ. (1994). A critical assessment of the effects of aminoguanidine and ascorbate on the oxidative modification of LDL: evidence for interference with some assays of lipoprotein oxidation by aminoguanidine, *J Lipid. Res.* 35.
183. MR et al. Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. *Congest Heart Fail* 2005; 11: 2130-44.
184. Nishigori H, Lee JW, Yamauchi Y, Iwatsuru M: The alteration of lipid peroxides in glucocorticoid induced cataract of developing chick embryos and the effect of ascorbic acid. *Curr Eye Res* 5: 37–40, 1986.
185. Petrovic VM, Saicic ZS, Spasic M, Radojicic R, Buzadzic B: Hormones and AO defence. In: OF Nygaard, AC Upton (eds). *Proc Int Conf Anticarcinog Radiat Prot* 2; 1989. Plenum, New York, 1991, pp 405–413.
186. Pereira B, Bechara EJH, Mendonca R and Curi R, 1999: Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of rats treated with dexamethasone. *Cell Biochem. Funct.* 17, 15–19.
187. Zeevalk GD, Bernard LP, Song C, Gluck M and Ehrhart J, “Mitochondrial inhibition and oxidative stress: reciprocating players in neurodegeneration,” *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 7, no. 9-10, pp. 1117–1139, 2005.
188. Kawamura T, Yoshioka T, Bills T, Fogo A, Ichikawa I: Glucocorticoid activates glomerular antioxidant enzymes and protects glomeruli from oxidant injuries. *Kidney Int* 40: 291–301, 1991.

189. Keeney SE, Mathews MJ, Rassin DK: Antioxidant enzyme responses to hyperoxia in preterm and term rats after prenatal dexamethasone administration. *Pediatr Res* 33: 177–180, 1993.
190. Orzechowski A, Ostaszewski P, Wilczak J, Jank M, Balasın'ska B, Wareski P and Fuller Jr JJ. Rats with a Glucocorticoid-Induced Catabolic State Show Symptoms of Oxidative Stress and Spleen Atrophy: The Effects of Age and Recovery *Vet. Med. A* 49, 256–263 (2002).
191. Çaylı S, Koçak A, Yılmaz U, Tekiner A, Erbil M, Öztürk Ç, Batçioğlu K, Yoloğlu S Effect of combined treatment with melatonin and methylprednisolone on neurological recovery after experimental spinal cord injury *Eur Spine J* (2004) 13 : 724-732.
192. Karlıdağ T, Yalçın Ş, Öztürk A, Üstündağ B, Gök Ü, Kaygusuz İ, Susaman N The role of free oxygen radicals in noise induced hearing loss: effects of melatonin and methylprednisolone *Auris Nasus Larynx* 29 (2002) 147–152.
193. Camm EJ, Tijsseling D, Richter HG, Adler A, Hansell JA, et al. (2011) Oxidative Stress in the Developing Brain: Effects of Postnatal Glucocorticoid Therapy and Antioxidants in the Rat. *PLoS ONE* 6(6): e21142. doi:10.1371/journal.pone.0021142.
194. Arima M, Kumai T, Asoh K, Takeba Y, Murano K, Goto K, Tsuzuki Y, Mizuno M, Kojima T, Kobayashi S, and Koitabashi Y Effects of Antenatal Dexamethasone on Antioxidant Enzymes and Nitric Oxide Synthase in the Rat Lung *J Pharmacol Sci* 106, 242 – 248 (2008).
195. Yoshioka T, Kawamura T, Meyrick BO, Beckman JK, Hoover RL, Yoshida H, Ichikawa I (1994) Induction of manganese superoxide- dismutase by glucocorticoids in glomerular cells. *Kidney Int* 45:211–219.
196. Atanasova S, Wieland E, Schlumbohm C, Korecka M, Shaw L, von Ahsen N, Fuchs E, Oellerich M, Armstrong V (2009) Prenatal dexamethasone exposure in the common marmoset monkey enhances gene expression of antioxidant enzymes in the aorta of adult offspring. *Stress* 12:215–224.
197. Moslen MT. Reactive Oxygen Species in Normal Physiology: Cell Injury and Phagocytosis, Free Radicals in "Diagnostic Medicine" , (Armstrong D., ed), 1-15, Plenum Press 1994; New York.

198. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.* 2000; 32:307-326.
199. Rees DD, Celtek S, Palmer RM, and Moncada S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 541–547, 1990.
200. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, and Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239–242, 1995.
201. Poliandri AH, Machiavelli LI, Quinteros AF, Cabilla JP, Duvilanski BH. Nitric oxide protects the mitochondria of anterior pituitary cells and prevents cadmium-induced cell death by reducing oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2006;40: 679–688.
202. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol.* 1996;9:836–844.
203. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153: 83-104.
204. Bharti KV, Srivastava RS, Subramanian P, Warren Spence D, Pandi-Perumal SR and Brown GM Cerebral Epiphyseal Proteins and Melatonin Modulate the Hepatic and Renal Antioxidant Defense of Rats *International Journal of Nephrology* Volume 2011, Article ID 142896, 5 pages doi:10.4061/2011/142896.
205. Padillo FJ, Cruz A, Navarrete C, Bujalance I, Briceño J, Gallardo JI, et al. Melatonin prevents oxidative stress and hepatocyte cell death induced by experimental cholestasis. *Free Radic Res* 2004; 38: 697-704.
206. Cruz A, Tasset I, Ramirez L. M, Arjona A, Segura J, Túnez I, Montilla P, Muntane J and Padillo F. J Effect of melatonin on myocardial oxidative stress induced by experimental obstructive jaundice *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas* 1130-0108/2009/101/7/460-463.
207. Erdem M, Bostan B, Güneş T, Özkan F, Şen C, Özyurt H, Köseoğlu RD, Erdoğan H Melatoninin iskelet kası iskemi-reperfüzyon yaralanması üzerine koruyucu etkisi *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi* 2010;21(3):166-171.