

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

**MELATONİN UYGULANAN FARELERİN KARACİĞER DOKUSUNDA  
GLUTATYON PEROKSİDAZ'IN İMMUNOHİSTOKİMYASAL DAĞILIMI  
VE RT PCR İLE GEN EKSPRESYONU**

**Araş. Gör. Serap KORAL TAŞÇI**  
**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Nurhayat YECAN GÜLMEZ**

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**2011 - KARS**

T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MELATONİN UYGULANAN FARELERİN KARACİĞER DOKUSUNDA  
GLUTATYON PEROKSİDAZ'IN İMMUNOHİSTOKİMYASAL DAĞILIMI  
VE RT PCR İLE GEN EKSPRESYONU**

**Araş. Gör. Serap KORAL TAŞÇI**  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
Prof. Dr. Nurhayat YECAN GÜLMEZ

**Bu çalışma KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu Tarafından  
desteklenmiştir. Proje No: 2009-VF-11**

**2011 - KARS**

T.C.  
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı çerçevesinde Arş. Gör. Serap KORAL TAŞÇI tarafından hazırlanmış olan “ **Melatonin Uygulanan Farelerin Karaciğer Dokusunda Glutatyon Peroksidaz’ın İmmunohistokimyasal Dağılımı ve RT PCR ile Gen Ekspresyonu** ” adlı bu çalışma, yapılan tez savunma sınavı sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy. Birleşti ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi  
26.09.2011

imza

**Adı Soyadı :**

Başkan : Prof. Dr. Nurhayat GÜLMEZ  
Üye : Prof. Dr. H.Hakan BOZKURT  
Üye : Prof. Dr. Şahin ASLAN  
Üye : Doç. Dr. Serpil DAĞ  
Üye : Doç. Dr. Ebru KARADAĞ SARI

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun ..... gün ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet ÇİTİL  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	I
TABLolar DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
GRAFİKLER DİZİNİ	V
RESİMLER DİZİNİ	VI
ÖNSÖZ	VII
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Serbest Radikaller	3
2.2.Antioksidan Savunma Sistemleri	5
2.3.Glutatyon Peroksidaz (GPx)	7
2.4.Melatonin	9
2.4.1.Melatoninin Sentez ve Metabolizması	9
2.4.2.Melatoninin Antioksidan Özelliği	11
2.5.Karaciğer	15
3.MATERYAL ve METOT	18
3.1.MATERYAL	18
3.1.1.Deney Hayvanı Materyali	18
3.1.2.Melatonin	18
3.2.METOT	19
3.2.1.Melatonin Uygulaması	19
3.2.2.Doku Örneklerinin Alınması	19
3.2.3.Histolojik İncelemeler	19
3.2.4.Moleküler Analiz (RT PCR)	21

3.2.5.İstatistiksel Analiz	25
4.BULGULAR	26
4.1.Histolojik Bulgular	26
4.2.İmmunohistokimyasal Bulgular	31
4.3.Moleküler Analiz Bulguları	37
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	41
6.ÖZET	47
7.SUMMARY	48
8.KAYNAKLAR	49
9.ÖZGEÇMİŞ	56

**SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**

ABC: Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks

AEC: 3-Amino-9-Ethyl Carbazole

AFMK: N-Asetil-N-Formil-5-Metoksikinürinamin

bç: Baz çifti

Cat: Katalaz

cDNA: Komplementer (tamamlayıcı) Deoksiribonükleik Asit

cGPx: Sitosolik Glutasyon Peroksidaz

CO<sub>2</sub>: Karbon dioksit

CuZnSOD: Bakır Çinko Süperoksit Dismutaz

dNTP: Deoksinükleosid Trifosfat

dk: Dakika

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DMPO: Dimethylpyroline N-Oxide

G6PD: Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz

GPx: Glutasyon Peroksidaz

GPx-GI: Gastrointestinal Glutasyon Peroksidaz

GSH: Glutasyon

GSSG: Okside Glutasyon

GSSG-Rd: Glutasyon Redüktaz

GST: Glutasyon-S-Transferaz

HE: Hematoksilen Eosin

HIOMT: Hidroksiindol -O-metil transferaz

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen Peroksit

IDO: İndolamin 2,3-Dioksijenaz

i.p.: İntraperitoneal

mg: Miligram

ml: Mililitre

MnSOD: Manganaz Süperoksit Dismutaz

mM: Milimolar

MMLV: Moloney Murine Leukemia Virus

mRNA: Mesajcı Ribonükleik Asit

MSH: Melanosit Uyarıcı Hormon

NAT: N-Asetiltransferaz

NF: Nuclease Free

nm: Nanometre

NO: Nitrik Oksit

NOS: Nitrik Oksit Sentetaz

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Süperoksit

OH: Hidroksil

PAS: Periyodik Asit Shiff

PBS: Fosfat Buffer Salin

pGPx: Plazma ya da Ekstrasellüler Glutatyon Peroksidaz

PHGPx: Fosfolipid Hidroperoksit Glutatyon Peroksidaz

RNA: Ribonükleik Asit

rRNAsin: Ribonükleaz İnhibitör

RT-PCR: Reverse Transkription- Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SOD: Süperoksit Dismutaz

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: Tris Borate EDTA (buffer)

UV: Ultra Viyole

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

**TABLolar DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 2.1.</b> Hücresele serbest radikallerin etkilediği moleküller ve sonuçları	4
<b>Tablo 2.2.</b> Antioksidanların genel sınıflandırılması	6
<b>Tablo 3.1.</b> Deney grupları ve yapılan uygulamalar	19
<b>Tablo 3.2.</b> Dokulardaki GPx 1 immunoreaktivitesinin derecelendirilmesi	21
<b>Tablo 4.1.</b> Karaciğerdeki yapılar ve reaksiyon yoğunluğu	31
<b>Tablo 4.2.</b> Karaciğerde GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin gruplar arası karşılaştırılması	39



**ŞEKİLLER DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Şekil 2.1.</b> Epifiz bezinde melatonin sentezinin kontrolü	11
<b>Şekil 2.2.</b> Melatoninin antioksidan özellikleri	14

**GRAFİKLER DİZİNİ****Sayfa No**

**Grafik 4.1.** GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması

39

**RESİMLER DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Resim 4.1.</b> Kontrol grubu farelerde karaciğerin genel görünümü	27
<b>Resim 4.2.</b> Kontrol grubu fare karaciğerinin Kiernan aralığı bölgesi histolojik görünümü	27
<b>Resim 4.3.</b> Kontrol grubu karaciğer dokusunda glikojen birikimi	28
<b>Resim 4.4.</b> Sham grubu karaciğer dokusu	28
<b>Resim 4.5.</b> Sham grubu karaciğer dokusunda glikojen birikimi	29
<b>Resim 4.6.</b> Deneme grubu karaciğer dokusunun histolojik görünümü	30
<b>Resim 4.7.</b> Deneme grubu karaciğer dokusunda glikojen birikimi	30
<b>Resim 4.8.</b> Kontrol grubu karaciğer dokusunda vena sentralisler etrafında GPx 1 immunoreaktivitesi	32
<b>Resim 4.9.</b> Kontrol grubuna ait dokuda GPx 1 immunoreaktivitesi	32
<b>Resim 4.10.</b> Sham grubu karaciğer dokusunda GPx 1 immunoreaktivitesi	33
<b>Resim 4.11.</b> Deneme grubu hepatositlerde sitoplazmik ve nükleer GPx 1 immunoreaktivitesi	34
<b>Resim 4.12.</b> Deneme grubu karaciğer dokusunda GPx 1 immunoreaktivitesi	35
<b>Resim 4.13.</b> Deneme grubunda GPx 1 immunoreaktivitesinin durumu	35
<b>Resim 4.14.</b> Deneme grubuna ait dokuda Kiernan aralığında GPx 1 immunoreaktivitesi	36
<b>Resim 4.15.</b> Deneme grubu karaciğer dokusunda (Primer antikor koyulmayan) negatif GPx 1 immunoreaktivitesi (Negatif kontrol)	36
<b>Resim 4.16.</b> RT PCR sonuçlarının densitometrik ölçüm sonuçları	37
<b>Resim 4.17.</b> RT PCR sonuçlarının densitometrik ölçüm sonuçları (Devamı)	38
<b>Resim 4.18.</b> GPx 1 geni RT PCR sonuçları	40

## ÖNSÖZ

Bu araştırmada, eksojen olarak uygulanan melatoninin, fare karaciğer dokusunda glutatyon peroksidaz enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonu ile glutatyon peroksidaz enziminin gen ekspresyonuna etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Doktora eğitimim boyunca, sadece bilgi ve deneyimleriyle değil, ilgisi ve manevi desteği ile de her zaman yanımda olan çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nurhayat YECAN GÜLMEZ'e, yine bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Hakan KOCAMIŞ'a, Prof. Dr. şahin ASLAN'a, Prof. Dr. Mümtez NAZLI'ya, Doç. Dr. Ebru KARADAĞ SARI'ya, Yrd. Doç. Dr. Turgay DEPREM'e, yine desteklerinden dolayı Öğr. Gör. Dr. Seyit Ali BİNGÖL ve Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Mahmut SÖZMEN ile Doç. Dr. Hasan ÖZEN'e, RT-PCR sonuçlarının dansitometrik ölçümlerindeki yardımlarından dolayı Missouri Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yüksel AĞCA'ya, istatistiksel değerlendirmelerde desteğini gördüğüm Doç. Dr. Turgut KIRMIZIBAYRAK'a, spektrofotometrik ölçümlerde desteğini gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Oğuz MERHAN'a, maddi desteğinden dolayı KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Yönetim Kurulu Başkanlığı'na, maddi ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Araş. Gör. Dr. Gencay Taşkın TAŞÇI'ya, ayrıca bugün bütün bu güzellikleri yaşamama vesile olup, sonsuz fedakârlık ve sevgileriyle hep yanımda olan anneme ve babama, yine sevgileriyle bana hep güç veren kardeşlerime ve ismini yazamadığım emeği geçen herkese çok teşekkür ederim.

## 1. GİRİŞ

Son yıllarda yapılan birçok araştırma serbest oksijen radikalleri ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki ilişkinin önemini ortaya koymaktadır. Organizmada, bazı reaksiyonlar sonucu kendiliğinden ya da çevresel bazı faktörlerin etkisiyle oluşan serbest radikaller önemli bozukluklara ve bunun sonucunda da birtakım hastalıklara neden olmaktadır.

Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların meydana getirebileceği hasarı önlemek için organizmada 'antioksidan savunma sistemleri' diye adlandırılan birtakım mekanizmaların varlığı belirtilmektedir. Antioksidan maddeler, endojen ve eksojen kaynaklı antioksidan maddeler olarak iki ana gruba ayrıldığı gibi, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz gibi enzimler ile vitaminler ve tiyoller gibi enzim olmayan antioksidanlar şeklinde yapılarına göre de sınıflandırılabilirler. Son zamanlarda endojen savunma sistemlerini güçlendirmek için normal olarak organizmada bulunan bazı antioksidan maddelerin eksojen olarak kullanıldığı, böylece antioksidan sistemin güçlendirildiği ve bu maddeler arasında melatoninin de bulunduğu belirtilmektedir (2,17,72).

Melatoninin normal olarak organizmada epifiz bezi tarafından salgılandığı ve çok güçlü antioksidan maddeler arasında olduğu, ayrıca melatoninin farklı yollarla antioksidan sistemi desteklediği belirtilmektedir. Melatoninin bazı önemli antioksidan enzimlerin (SOD, GPx, katalaz gibi) gen ekspresyonları ve enzim aktiviteleri üzerine önemli etkilerinin olduğundan bahsedilmektedir (39,72).

Bu çalışmada, eksojen olarak melatonin uygulanan farelerin karaciğer dokusunda glutatyon peroksidaz enziminin gen ekspresyonunun RT-PCR yöntemi ile belirlenerek, dışarıdan uygulanan bu maddenin enzimin gen ekspresyonuna etkisinin belirlenmesi ve bu enzimin karaciğer dokusunda lokalizasyonunun immunohistokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

Yaşlanma, kanser, alzheimer, ateroskleroz, myokardiyal enfarktüs gibi ciddi hastalıkların patogeneğinde rol oynayan serbest oksijen radikalleri ile mücadelede antioksidan maddelerin öneminin oldukça büyük olduğu belirtilmektedir (2,54,70). Bizim çalışmamızdan elde edilecek bulguların, bahsedilen bu önemli hastalıkların koruma ve tedavisinde moleküler düzeyde destek sağlayıp, bilime ve yeni tedavi yöntemlerine ışık tutacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Serbest Radikaller

Oksijen, yaşam için çok gerekli olan bir molekül olmakla birlikte, oksijen metabolizması sonucu serbest radikaller diye adlandırılan süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ) gibi çok zararlı reaktif moleküller meydana gelebilir. Bu moleküllerin serbest elektron taşıyan kararsız bileşikler olduğu ve bir zincir reaksiyonuna neden olmak suretiyle diğer moleküllerle reaksiyona girebildikleri bildirilmektedir (47).

Serbest radikal ifadesi, atomik ya da moleküler yapılarında çiftlenmemiş bir ya da daha fazla tek elektron taşıyan moleküllere verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolay bir şekilde elektron alış verişine giren bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen partikülleri gibi isimlerin de verildiği belirtilmektedir (20).

İçinde yaşadığımız çevrede birçok fiziksel ve kimyasal olay nedeniyle sürekli bir radikal yapımının söz konusu olduğu ve hücre sel koşullarda da oldukça çok miktar ve çeşitlilikte serbest radikal üretildiği bildirilmektedir (37).

Radikaller üç temel mekanizma ile oluşmaktadırlar;

- 1-Kovalent bağların homolitik kırılması sonucu
- 2- Normal bir molekülün elektron kaybetmesi sonucu
- 3- Normal bir moleküle elektron transferi sonucu

Biyolojik sistemlerde bulunan en önemli serbest radikallerin oksijenden meydana gelen radikaller olduğu, bunlar arasında en önemli rolü oynayanların oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalının olduğu belirtilmektedir. Elektron transport zincirinden elektron sızıntısı hücrelerdeki en büyük serbest radikal kaynağıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş olarak bulunan oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgenmiş zaman mitokondrial süperoksit radikal üretimi artmaktadır. Serbest radikal üretimi, endoplazma retikulumu ve nükleer membranlarda ise membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan

kaynaklanmakta ve bunların dışında hava kirliliği, radyasyon, sigara ve alkol tüketimi ile stres durumları da serbest radikal oluşumuna neden olan etkenler arasında sayılmaktadır (2).

Serbest radikallerin etkileri Tablo 2.1' de belirtilmiştir (3).

**Tablo 2.1:** Hücresel serbest radikallerin etkilediği moleküller ve sonuçları (3)

<u>Etkilenen bileşik</u>	<u>Sonuçlar</u>
1. Doymamış aminoasitler ve kükürt içeren aminoasitler	- Protein denatürasyonu - Çapraz bağlanma - Enzim inhibitasyonu - Hücre geçirgenliğinde değişimler
2. Nükleik asit bazları	- Mutasyon - Hücre gelişiminde değişimler
3. Karbonhidratlar	- Hücre yüzey reseptörlerinde değişim
4. Doymamış lipitler	- Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu
5. Kofaktörler	- Askorbat ve porfirin oksidasyonu - Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma
6. Antioksidanlar	- $\alpha$ -tokoferol ve $\beta$ -karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması
7. Proteinler	- Peptit zincirinde kırılmalar - Denaturasyon
8. DNA	- Zincirde kırılmalar - Baz modifikasyonları
9. Hyaluronik asit	- Sinoviyal sıvının vizkozitesinde değişim



## 2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Hücrel yaşamın devamlılığı birçok karmaşık biyokimyasal tepkimenin denge içerisinde yürütmesine bağlıdır ve bu dengeyi bozacak endojen ve eksojen kaynaklı çeşitli faktörler hücre hasarına yol açmaktadırlar. Bunlar içerisinde oksidatif stres, çeşitli patolojik durumların ortaya çıkmasına sebep olması nedeniyle giderek önem kazanmakta ve araştırmacıları bu yönde araştırmalar yapmaya yönlendirmektedir. Radikal reaksiyonları hücre homeostazının bir parçası olmakla birlikte, sağlıklı hücreler homeostatik olarak antioksidanları kullanarak serbest radikaller tarafından meydana gelebilecek hasarları ortadan kaldırırlar. Hücreler böylece, reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı antioksidan savunma sistemleri ile korunmuş olurlar (4).

Antioksidanların dört ayrı etki şekli vardır:

- 1- Toplayıcı etki (scavenging etki)
- 2- Bastırıcı etki (quencher etki)
- 3- Onarıcı etki (repair etki)
- 4- Zincir kırıcı etki (chain breaking etki)

Serbest radikalleri etkileyip onları tutma ya da çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirmeye toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler bu şekilde etki gösterirler. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşerek onlara birer hidrojen aktarıp aktivitelerini azaltan ya da inaktive eden olaya bastırıcı etki denir. Bu tip etkiye örnek olarak vitaminler gösterilebilir. Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarının engellenmesine zincir kırıcı etki denilmektedir. Hemoglobin ve mineraller bu tarz etki gösterirler. Onarıcı etkili antioksidanlar ise, serbest radikallerin oluşturdukları hasarları onararak etki gösterirler. Antioksidan maddeler ve bunların genel sınıflandırılması Tablo 2.2 'de gösterilmiştir (2).

**Tablo 2:2.** Antioksidanların genel sınıflandırılması (2)

ENDOJEN ANTIOKSİDANLAR		EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR	GIDA ANTIOKSİDANLARI
Enzimler	Enzim Olmayanlar		
-Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi	a) Lipit fazda bulunanlar	-Ksantin Oksidaz İnhibitörleri	-Butylated hydroxytoluene (BHT)
-Süperoksid dismutaz	- $\alpha$ -tokoferol (E vit.)	Tungsten	-Butylated hydroxyanisole (BHA)
-Katalaz	- $\beta$ -karoten	Folik asit	-Sodium benzoate
-Glutasyon	b) Sıvı fazda (sitosol ya da kan plazmasında) bulunanlar	Oksipürinol	-Ethoxyquin
Peroksidaz	-Askorbik asit	Allopürinol	-Propylgalate
-Glutasyon -S-transferaz	-Melatonin	-Soya fasulyesi inhibitörleri	-Fe-süperoksid dismutaz
-Hidroperoksidaz	-Ürat	-NADPH Oksidaz inhibitörleri	
	-Sistein	Adenozin	
	-Laktoferrin	Lokal anestezikler	
	-Transferrin	Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar	
	-Miyoglobin	Diphenylene iodonium	
	-Hemoglobin	-Rekombinant Süperoksid dismutaz	
	-Ferritin	-Ebselen	
	-Metionin	-Asetilsistein	
	-Albumin	-Mannitol,albumin, Barbitüratlar, Demir şelatörleri, Sitokinler, Nötrofil adezyon inhibitörleri....	
	-Glutasyon		
	-Bilirubin		

### 2.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Doğal süreç içerisinde biyolojik sistemlerde metabolizma ve çevresel faktörler neticesinde moleküler oksijenden süperoksit, hidroksil ve hidrojen peroksit gibi serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri meydana gelebilmektedir. Oluşan bu reaktif türler, çeşitli yollarla etkisizleştirilmediği sürece organizmada, zar yapısına, genetik materyale ve vücutta önemli fonksiyonlara sahip birçok moleküle zarar vererek hücrel yapıyı tehdit etmektedirler. Bu zararlı maddelerin meydana getireceği hasarı önlemek için organizmada antioksidan savunma sistemi görev yapmaktadır. Bu sistemin birçok elemanından bir grubunu oluşturan antioksidan enzimlerden peroksidazlar hidrojen peroksiti su ve oksijene indirgeyerek hücrenin karşılaşılabileceği hasarları bir nebze engellerler (30).

Glutasyon peroksidazlar adıyla anılan bir grup enzim, peroksit redüksiyonunu katalize etmektedirler. Bu enzimler, selenyum içerikleri, fiziksel özellikleri ve substrat özgüllüğü bakımından, hem molekülü içeren peroksidazlardan farklılıklar göstermektedirler (24).

Hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan glutasyon peroksidaz'ın molekül ağırlığının yaklaşık olarak 85.000 D. olduğu bildirilmiştir. Dört selenyum atomu içeren (tetramerik) sitosolik bir enzimdir (2).

Glutasyon peroksidaz (GPx), katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler reaktif oksijen türlerinin yakalanması ve hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasında çok büyük önem taşımaktadırlar. Glutasyon peroksidaz'ın selenyum içeren ya da içermeyen çeşitli formları görülmektedir (52).

Selenyum içeren Glutasyon peroksidaz ailesinin dört üyesi bulunmaktadır: cGPx (GPx1, sitosolik ya da sellüler GPx), GPx-GI (GPx2, gastrointestinal GPx), pGPx (GPx3, plazma ya da ekstrasellüler GPx) ve PHGPx (GPx4, fosfolipid hidroperoksit GPx) (34).

Glutasyon peroksidaz 1 (GPx1), ilk olarak 1957 yılında Mills tarafından ortaya koyulmuş, bu enzimin oksidasyondan kaynaklanan hemolize karşı kırmızı kan hücrelerini koruduğu öne sürülmüştür (48).

Sellüler, sitosolik ya da başka bir ifadeyle klasik GPx (GPx1, cGPx), her zaman yaygın olarak bulunmaktadır. Hayvanlarda yapılan hücre kültürü ve genetik çalışmalar GPx1'in oksidatif hasarı önlemedeki fonksiyonunu ortaya koymuştur. Gastrointestinal GPx (GI-GPx), gastrointestinal sistemden eksprese edilmektedir ve bu sistemde hidroperoksitlere karşı bir bariyer görevi yapmaktadır. Plazma GPx (pGPx), ekstrasellüler kompartmanlarda yer alır ve böbrek gibi vücut sıvıları ile ilişkili çeşitli dokularda eksprese edilir. Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PHGPx) ise membran lipidlerini koruyan bir enzimdir (16).

Glutasyon peroksidaz, fagositik hücrelerde diğer antioksidanlarla birlikte, solunum patlaması esnasında fagositik hücrelerin zarar görmelerini engellemektedir. Solunum patlaması, fagositik hücrelerin oksijen tüketimi sonucunda süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali gibi oksidan ürünler açığa çıkararak bu ürünlerin fagositoz esnasında mikroorganizmaların ve diğer yabancı hücrelerin yıkımında kullanılmasıdır. Fakat bu oksidan ürün miktarı antioksidan savunma gücünü aştığında normal konak hücrelerine de zararlı olurlar. Glutasyon peroksidaz bu gibi durumlarda hücreyi korumaktadır. Eritrositlerde de oksidan strese karşı en etkili antioksidan glutasyon peroksidaz'dır. Hücrelerde bu enzimin aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır. Eritrosit glutasyon peroksidaz aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromunda yüksek, prematürelere düşük bulunmuştur. Lökosit glutasyon peroksidaz aktivitesinin ise yine yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksek olduğu belirtilmiştir (2).

Yapılan bir çalışmada (65), glutasyon peroksidazın karaciğerdeki en önemli antioksidan enzim olduğu bildirilmiştir.

## 2.4. Melatonin

### 2.4.1. Melatoninin Sentez ve Metabolizması

Melatonin, epifiz bezi ya da pineal bez olarak adlandırılan bez tarafından endojen olarak salgılanmaktadır (35,50).

Epifiz olarak da adlandırılan pineal bezin varlığı eski zamanlardan beri bilinmekle beraber bez ile ilgili gelişmeler üç büyük döneme ayrılabilir. Birinci dönem; İ.Ö. 3. yüzyılda Herophilus tarafından pineal bezin bulunmasıyla başlamaktadır. Pineal sözcüğü Latince'de çam kozalağı anlamına gelen "pinea" kelimesinden köken alır. Anatomik yapısı Vesalius (1514-1564) tarafından tanımlanmıştır. Orta çağın ünlü filozof, hekim ve matematikçisi Rene Descartes (1596-1650) pineal bezi "ruhun yerleştiği yer" olarak tanımlayarak önemini ortaya koymuştur. İkinci dönemde; Kolliker, memelilerin pineal bezinde sinir liflerinin varlığını gözlemlemiştir (1850), Cajal da fare pineal bezinde demet yapan sinir liflerini bulmuş ve bu sinir liflerinin sempatik kökenli olduğunu iddia etmiştir (1904). Üçüncü dönem ise son 50 yılı kapsamaktadır (19). Lerner ve arkadaşları (42) 1958 yılında pineal bez ile ilgili çalışmalarda önemli bir adım atmışlar ve pineal bezin temel hormonu olan melatoninini tanımlamışlardır.

Korpus pineale olarak da adlandırılan epifiz, sinirsel kökenlidir. Habenula denilen epifiz sapı ile ara beyine (diensefalon'a) bağlıdır. Organ dıştan Pia mater ile sarılmıştır ve bağdoku, içeriye bölmeler halinde girer. Organın parenşiminde, pinealosit olarak da adlandırılan pineal hücreler ve modifiye gliya hücreleri olmak üzere iki tip hücre bulunur (11,35, 68).

Pineal hücreler melatonin adı verilen bir hormon salgırlar. Bu hormon serotoninle yakınlığı bilinen bir aminoasit olan indol türevidir. Melatoninin, ara hipofizden (pars intermedya) salgılanan ve pigment yapımını uyaran melanosit uyarıcı hormonun (MSH) tersine, pigmentasyonu önlediği ve deri renginin açılmasına sebep olduğu belirtilmiştir. (68).

Melatonin sentezi, dolaşımda bulunan triptofanın pinealosit içerisine alınmasıyla başlayan ve dört ardışık enzimatik reaksiyon sonucunda

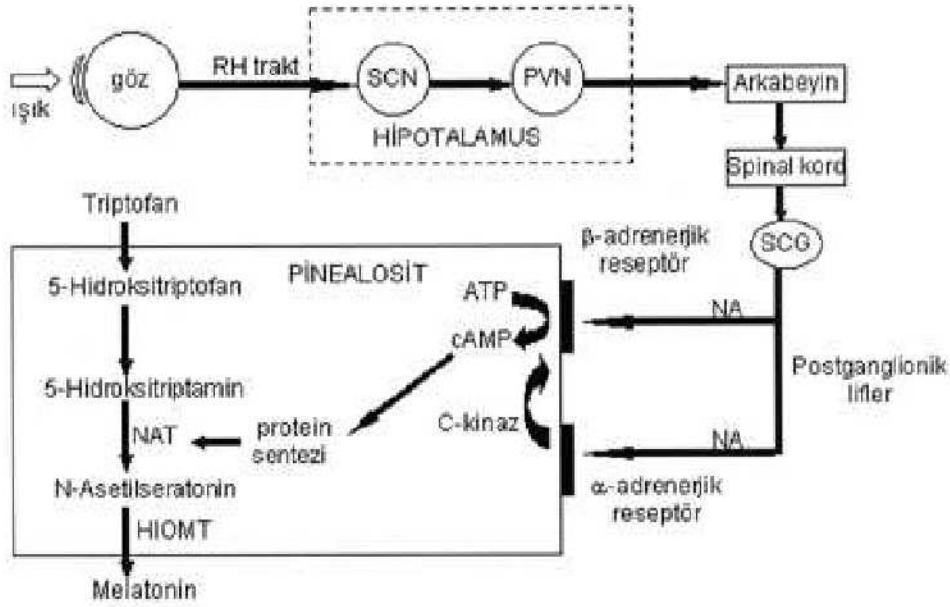
tamamlanan bir süreci kapsar. İlk aşamada hidrosilasyon reaksiyonuyla 5-OH triptofan oluşur, ikinci aşamada triptofan dekarboksilasyonla seratonine dönüşür ve sonra sırayla N-asetilasyon ve O-metilasyon reaksiyonlarıyla, seratoninden melatonin (5-metoksi-N-asetil triptamin) oluşur (19,66).

Işığa bağlı olarak gelen uyarımlar gözün retina katmanı ile alınarak fotoreseptörlere ulaştırılır ve buradan hipotalamustaki suprakiazmatik çekirdeğe iletilir. Bu uyarımlar sonra paraventriküler çekirdeğe ulaşır, oradan da omuriliğin lateral çekirdeğine gider. Daha sonra bu çekirdekten sempatik sinir sistemine ait adrenejik sinirlerle uyarımlar üst beyin gangliyonuna gelir ve buradan pineal beze ulaşır (70,73).

Pineal bez içerisinde bulunan sempatik sinir uçlarındaki en önemli nörotransmitter madde noradrenalinidir. Noradrenalin, postsinaptik reseptörler olan ve pinealosit membranında bulunan b ( $\beta$ ) ve a ( $\alpha$ ) reseptörlerine bağlanır. Adrenerjik b ( $\beta$ ) ve a ( $\alpha$ ) reseptörlerinin uyarılması sonucunda hücre içerisinde cAMP ve N-asetiltransferaz (NAT) artışı meydana gelmektedir. Melatoninin ön maddesi bir aminoasit olan triptofandır. Triptofan pinealositler içerisinde önce seratonine ve daha sonra da melatonine dönüşmektedir. Melatonin salınımı geceleri büyük bir artış göstermekle birlikte, melatonin düzeyinin yüksek kalma süresi karanlığın süresine bağlıdır. Karanlığın daha uzun sürdüğü kış aylarında bu süre daha uzundur. Pinealektomi melatoninin gece yükselmesini önlemektedir (6,55).

Aydınlıkta pineal hücrelere dolaşımdan gelen triptofana, triptofan-5-hidroksilaz enzimi aracılığı ile -OH grubu eklenir ve 5-OH-triptofan oluşur. 5-OH-triptofandan asit L-aminoaromatik dekarboksilaz enziminin etkisi sonucunda karboksil grubundan CO<sub>2</sub> ayrılır ve seratonin meydana gelir. Karanlıkta seratonine, norepinefrin ve seratonin-N-asetil transferaz (NAT) etkisiyle asetil grubu eklenir ve N-asetil seratonin oluşur. Daha sonra da seratonine hidroksiindol-O-metil transferaz (HIOMT) enzimi etkisiyle metil grubu eklenir ve sonuçta melatonin meydana gelir. Bu olayların seratonine kadar olan kısmı aydınlıkta olur. Dolayısı ile gündüzleri triptofan ve seratonin düzeyleri yüksektir. Seratoninden sonra meydana gelen olaylar karanlıkta meydana gelir ve gece boyunca melatonin düzeyi yüksek kalır (54,73).

Melatoninin inaktivasyonu karaciğerde gerçekleşmektedir. İndol halkasının 6. konumundan hidroksile olan melatonin, daha sonra sülfat ya da glukuronik asitle konjuge edilerek idrarla atılmaktadır (14).



**Şekil 2.1:** Epifiz bezinde melatonin sentezinin kontrolü. SCN; Suprakiazmatik nükleus, RH; retinohipotalamik, PVN; Paraventriküler nükleus, SCG; Superior servikal ganglion, NA; Norepinefrin, NAT; 5-Hidroksitriptamin-Nasetiltransferaz, HIOMT; Hidroksiindol-O-metiltransferaz (19).

## 2.4.2. Melatoninin Antioksidan Özelliği

Aerobik canlılarda, serbest oksijen radikallerinin oluşumu sonucunda meydana gelebilecek zararlı etkilerin önlenmesi amacıyla antioksidan savunma sistemleri diye adlandırılan çeşitli mekanizmalar gelişmiştir. Antioksidan maddeler, Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GSSG-Rd), katalaz gibi enzimler, vitaminler ve tiyoller gibi enzim olmayan antioksidanlar şeklinde yapısal özelliklerine göre sınıflandırılabilirler (2,72). Son yıllarda, endojen savunma sistemini güçlendirmek amacıyla, doğal olarak organizmada bulunan antioksidan

özellikte birtakım farmakolojik ajanların kullanılmakta olduğu ve bunların ekzojen savunma sistemleri olarak adlandırıldığı, bunlar arasında melatoninin de bulunduğu bildirilmektedir (17,72).

Melatonin hormonunun endokrin sistemin düzenlenmesi, immun fonksiyonların artırılması, düz kas tonusunun ayarlanması ve gonadal fonksiyonların baskılanması gibi birçok fizyolojik işlevlerde rol oynadığı, aynı zamanda güçlü bir antioksidan olduğu bildirilmiştir (17). Melatoninin bir antioksidan olduğu literatürlerde ilk defa lanăş ve arkadaşları (33) tarafından 1991 yılında belirtilmiştir. Bu özelliği sayesinde dokularda lipid peroksidasyonu sonucu oluşan oksidatif hasarı önlediği belirtilmiştir (43).

Esansiyel aromatik aminoasit olan triptofandan türeyen indoller ve bunlar arasında en önemlisi olan melatonin, elektron transferinin düzenlenmesinde, reaktif ara ürün radikallerinin detoksifiye edilmesinde, peroksidatif reaksiyon zincirlerinin kuvvetli bir biçimde kontrol edilmesinde büyük bir öneme sahip, antioksidan bir maddedir. Bu antioksidan özelliğın organizmadaki karşılığı ise hücre ve doku bütünlüğünün korunmasıdır. Organizmanın biyokimyasal işleyişinde, oksidasyon ara ürünleri ve dolayısı ile oksidatif stresin meydana gelmesi kaçınılmazdır. Fakat organizma oksidatif strese karşı antioksidan savunma sistemleri ile oksidatif stres sonucu oluşacak hasarlardan kendisini korumaktadır (55,57,59).

Melatonin, serbest radikaller arasında en zararlısı olan OH radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidan özelliğe sahiptir. Antioksidanların OH radikaline karşı olan etkinliklerinin araştırılması ve karşılaştırılması amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda, OH'in 5,5-dimethylpyroline N-oxide (DMPO) ile olan reaksiyonu sonucu oluşan ürünü (DMPO- OH) ölçülmektedir. Bunun nedeni, OH'in çok kısa ömürlü olması nedeniyle doğrudan ölçülmesinin oldukça zor olmasından kaynaklanmaktadır. Bu tür çalışmalarda, DMPO bulunan bir ortamda ilk önce ultraviyole ışık (254 nm) etkisi ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' den OH sağlanmış ve daha sonra da melatonin, glutatyon ve mannitolün DMPO- OH oluşumunu engellemelerindeki etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, DMPO- OH sentezini %50 inhibe etmek için gerekli olan melatonin, glutatyon ve mannitol miktarları sırasıyla 21, 123, 283



$\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, melatoninin diğer iki önemli antioksidan madde olan glutatyon ve mannitol'e göre çok daha güçlü bir antioksidan olduğunu ortaya koymuştur. Melatoninin, OH radikali ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüştüğü ve bunun sonucunda da ortamda bulunan  $\text{O}_2^{\cdot-}$  radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir (2).

Melatoninin antioksidan etkisi üç temel başlıkta toplanmıştır:

**a. Direkt Antioksidan Etki:** Melatonin antioksidan özelliği yapısında bulunan pirol halkasından ileri gelmektedir. Fizyolojik koşullarda birçok indol melatonine benzer şekilde yıkılır, fakat  $\text{O}_2$  varlığında melatoninin pirol halkasının indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) ile enzimatik veya hemin ile nonenzimatik olarak yıkımı, yüksek reaktivasyon gücüne sahip, N<sup>1</sup>-asetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoksikinüramin (AFMK) oluşumuyla sonuçlanır. Melatoninin  $\text{H}_2\text{O}_2$  varlığında da AFMK oluşturduğu ve bunun da radikal tutucu aktivite gösterdiği ortaya koyulmuştur. AFMK oluşumuna yol açan başka bir mekanizma ise, yüksek bir affinite ile OH radikalini bağlayabilen melatoninin, indolil katyon radikalini oluşturup bu radikalini de  $\text{O}_2$ 'i yakalayarak AFMK 'e dönüştürmesidir (29,62,72).

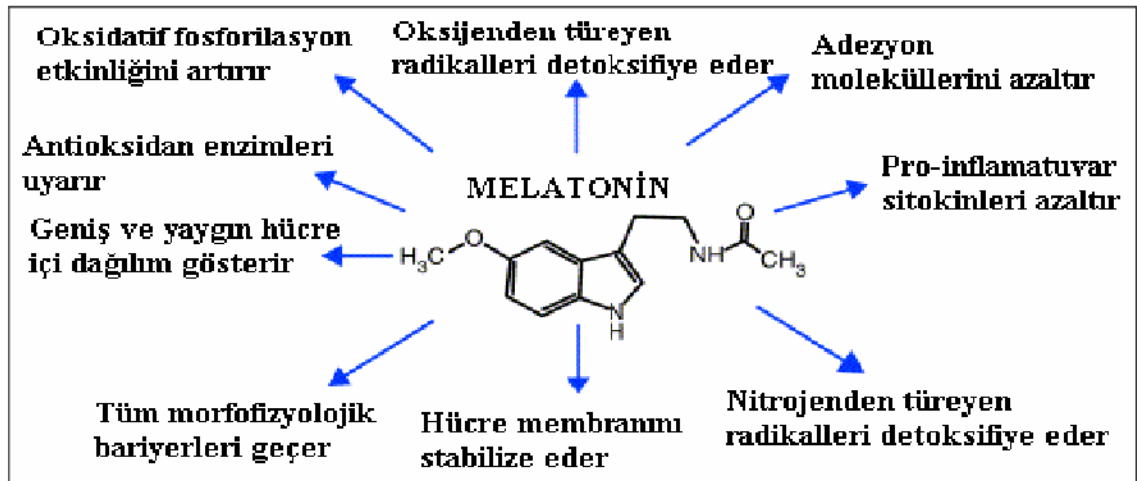
**b. Antioksidan Enzim Aracılı Etki:** Farmakolojik ve fizyolojik düzeylerdeki melatoninin SOD, GPx, Glukoz -6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve g-glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını veya aktivitelerini arttırdığı ve bu şekilde de oksidatif stres sonucu meydana gelebilecek hasarı önlediği belirtilmektedir (1,39,60,61).

Ratlara akut/kronik uygulanan melatoninin beyin dokusunda Mn-SOD ve CuZn-SOD sentezini arttırdığı ve bu şekilde beyin dokusunu oksidatif hasara karşı koruduğu gösterilmiştir (39). Pinealektomi yapılan ratlarda karaciğer, akciğer ve beyin GPx aktivitelerinde belirgin düşüşler kaydedilmiştir (56).

Benzer şekilde Baydaş ve arkadaşları (12), yaptıkları çalışmalarında pinealektomize ratların çeşitli dokularındaki GPx seviyesinin azaldığını, dolayısı ile GPx aktivitesini uyaran en önemli faktörün melatonin olabileceğini düşünmüşlerdir.

**c. Prooksidan Enzim Aracılı Etki:** Melatoninin prooksidan enzimlerden bazılarını inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu şekilde de antioksidan sistemi desteklediği belirtilmektedir. İn vivo ve in vitro çalışmalarda, NO ve ONOO<sup>-</sup> oluşumuna neden olan nitrik oksit sentetaz (NOS) aktivitesinin, fizyolojik dozlarda melatonin tarafından inhibe edildiği bildirilmektedir (13, 72).

Melatoninin diğer bir özelliği de, hem suda hem de yağda çözünebilir olmasıdır. Dolayısı ile hücrenin hemen bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşarak çok geniş bir alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Kan-beyin bariyerini ve plasentayı kolaylıkla geçebilen melatonin için bilinen hiçbir morfofizyolojik bariyerin olmaması, melatoninin diğer antioksidan maddelere karşı olan üstünlüğünün göstergesidir. Melatoninin hücre çekirdeğine girebilmesi, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunması bakımından da diğer antioksidanlardan daha üstün olduğunu göstermektedir. Serbest oksijen radikalleri oluşturarak kansere sebep olan safrol'ün DNA üzerinde oluşturabileceği hasarın melatonin tarafından etkili bir biçimde inhibe edildiği bildirilmiştir (2).



Şekil 2.2. Melatoninin antioksidan özellikleri (58).

## 2.5. Karaciğer

Safra yapımı, metabolik artıkların atılması, yağ, glikojen ve bazı vitaminlerin (vitamin A ve B) depolanması, detoksifikasyon, sentez (fibrinojen, protrombin, globulin v.s.), fagositoz ve embriyonal dönemde kan yapımı gibi hayati fonksiyonları olan karaciğer, embriyolojik olarak duodenum epitelinde (endoderm) meydana gelen tomurcuklanmayla gelişmeye başlamaktadır (25,28). Duodenumun ventral duvarındaki barsak epitelinin ventral mezenteriyum içerisine doğru yaptığı bu tomurcuk ilk başta tek iken, daha sonra divertikül halini alarak iki kola ayrılmaktadır (31). Bu iki kol, karaciğer paransimini oluşturacak olan pars hepatica ve safra kesesini oluşturacak olan pars sistika'dır. Pars hepatica aşırı şekilde gelişip dallanarak karaciğerin borucuklar sistemini meydana getirirken, borucukların uç kısımlarındaki endodermal epitel hücreleri yoğun bir şekilde çoğalarak karaciğerin fonksiyonel hücreleri olan hepatositlere farklılaşmaktadırlar (75).

Pars sistika ise ductus cysticus ve safra kesesini (vesica fella) meydana getirmektedir. Çevrede bulunan mezenşim dokudan da Glisson kapsülü ve ara doku (interstitium) oluşmaktadır (31).

Glisson kapsülü, kollagen ve elastik iplikler içeren, karaciğeri saran bağ dokudan bir kapsüldür. Bağ doku organın içerisine girerek karaciğeri lop ve lopçuklara ayırmaktadır (25,28).

Karaciğer lopçukları, yapısal ve fonksiyonel özellikleri ile kan ve safranın akış yönü dikkate alınarak üç ayrı şekilde incelenmektedir:

- **Klasik hepatik lopçuk:** Merkezi bir vena (vena sentralis) çevresinde karaciğer epitelyum hücreleri olan hepatositlerin kordonlar oluşturarak ışınal tarzda yerleşmesi sonucu meydana gelen lopçuktur. Deve ve domuzda belirgindir. Kan akışı periferden vena sentralise doğrudur.

- **Portal lopçuk:** Bu tip lopçukta karaciğer üçlüsünün bulunduğu alan merkez kabul edilir. Portal lopçuk üçgen şeklindedir ve köşeleri komşu üç klasik lopçuğun vena sentralisleridir. Safranın akış yönü portal lopçuğun merkezine doğrudur.

•**Karaciğer asinusları:** Asinusların sınırlarını arteriya hepatikanın terminal kolları meydana getirmektedir (28,68).

Karaciğerin asıl yapısını karaciğer epitel hücreleri ya da diğer bir adıyla hepatositler meydana getirmektedir. Karaciğerin esas hücreleri olan hepatositlerin, toksik maddelerin biyotransformasyonu, lipit, protein ve karbonhidrat metabolizmasındaki görevleri yanında bir diğer önemli görevi de safra yapımıdır. Hepatositler, safra asiti ve tuzlarının yanı sıra safra pigmentlerini de salgılayarak safra yapımını sağlarlar. Safra lopçuk dışına Hering kanalı ile taşınır ve lopçuklar arasındaki safra kanalına (duktus biliferus) ve oradan da karaciğerden ayrılan duktus hepatikusa geçer. Duktus hepatikus, duktus sistikus ile birleşerek duktus koledokus adını alır ve duodenumun başlangıç kısmına açılır. Hepatositlerde üretilen safranın kolesterol, safra asitleri, bilirubin ve elektrolit salgısı, barsak lumeninden yağların emilimi, enterohepatik dolaşım yoluyla barsaklara IgA taşınması gibi önemli fonksiyonları vardır (11,28,68).

Hepatositler, karaciğer lobülü içinde anastomozlar yaparak, Remark kordonları olarak adlandırılan kordonları meydana getirmek üzere, lobülün periferinden merkezine doğru ışınal bir şekilde dizilmişlerdir. Bu hücre plakları arasında kapillerler bulunur. Pencereci endotelial hücre tabakasından oluşan, düzensiz olarak genişlemiş bu damarlara karaciğer sinüzoidleri denilmektedir. Sinüzoidler ile hepatositler arasında bir boşluk bulunur ki buna da Disse aralığı adı verilir, burada kan ile hepatositler arasında madde alış veriş sağlanmaktadır ( 28,35,68).

Sinüzoid duvarındaki endotel hücreleri arasında Kupffer hücreleri olarak adlandırılan fagositoz yapan hücreler bulunur. Perisinüzoidal alanda Ito hücreleri denilen, yağ ve A vitamini depolayan hücreler de bulunmaktadır. Patolojik hallerde Ito hücreleri kollagen üreten hücrelere dönüşerek karaciğerde fibrozise neden olmaktadır (28,68).

Karaciğerin lopçukları arasında karaciğer üçlüsü ya da portal triad denen yapılar bulunmaktadır. Karaciğer üçlüsünü; safra kanalı, hepatik arter ve hepatik portal ven (v.interlobularis) oluşturmaktadır. Bunların etrafını

interlobuler bağ doku sarmaktadır. Bu yapıların dışında, burada sinirler ve küçük lenfatik damarlar da bulunmaktadır (11).

Karaciğere pankreas, dalak ve sindirim sisteminden gelen vena porta ve oksijen taşıyan arteriya hepatika ile olmak üzere iki şekilde gelen kan, karaciğer sinzoidlerine aılırarak vena sentralise geçer. Buraya gelen kan vena sentralislerin birleşmesiyle oluşan sublobuler venlere, buradan da sublobuler venlerin birleşmesiyle oluşan vena hepatikalara gider ve sonra vena kava kaudalise ulaşır (28).

### 3. MATERYAL ve METOT

Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan onay (14.05.2009 tarih ve 03 sayılı oturum) sonrası yapılan bu çalışmanın bütün deneysel uygulamaları Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi (KAÜ) Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ile KAÜ Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Deney Hayvanı Materyali

Yapılan çalışmadaki deney hayvanları, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesinden elde edilmiş olan farelerin çoğaltılması sonucu meydana gelen yeni nesil farelerden oluşmaktadır. Çalışmada ergin dönemdeki 24 adet erkek *Swiss albino* fare kullanılmıştır. Fareler çalışma süresince standart fare yemi (Erzurum Bayramoğlu Yem Fabrikası A.Ş.'de üretilmiştir) ile beslenirken, su alımı da serbest bırakılmıştır. Deney fareleri, standart fare kafeslerinde,  $22 \pm 2$  °C oda sıcaklığındaki standart ortamda tutulmuşlardır. Deney grupları ve yapılan uygulamalar Tablo 3.1 'de gösterilmiştir.

##### 3.1.2. Melatonin

Deneme grubuna uygulanan melatonin (Sigma-M5250) soğuk zincir altında getirildikten sonra çalışma süresince - 20°C'de saklandı.

## 3.2. METOT

### 3.2.1. Melatonin Uygulaması

**Tablo 3.1.** Deney grupları ve yapılan uygulamalar

Deney Grupları	Denek Sayısı	Deneysel Uygulamalar
Deneme Grubu	8	Etanolde çözdürülüp serum fizyolojikle sulandırılmış 10 mg/kg dozdaki melatonin 28 gün süreyle günlük olarak i.p. yolla enjekte edildi
Kontrol Grubu	8	Hiçbir Uygulama yapılmadı
Sham Grubu	8	28 gün süreyle her gün deneme grubuna uygulanan miktarda etanol ve serum fizyolojik i.p. yolla uygulandı

### 3.2.2. Doku Örneklerinin Alınması

Dört haftalık (28 gün) deney süresi sonunda farelere servikal dislokasyonla ötenazi yapıldıktan sonra karaciğer doku örnekleri alındı.

Alınan karaciğer doku örnekleri iki kısma ayrıldı. Moleküler analizler için alınan örnekler Tri-reagent içerisinde homojenize edildikten sonra +4°C'de muhafaza edildi. Histolojik incelemeler için kullanılacak örnekler ise Bouin tespit solüsyonuna alındı. Dokular tespit edildikten sonra dereceli alkollerden, metil benzoat ve benzollerden geçirilip parafinde bloklandı.

### 3.2.3. Histolojik İncelemeler

Histolojik değerlendirmeler amacıyla parafin bloklardan alınan 4 µm kalınlığındaki kesitlere, Hematoksilen-Eosin, Crossmann'ın üçlü boyaması (Triple boyama) ve periodik asit Schiff (PAS) boyamaları uygulandı (44).

Karaciğer dokusunda GPx 1'in immunoreaktivitesini incelemek için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks (ABC) tekniği (32) kullanıldı. Parafin bloklardan alınmış olan 4 µm kalınlığındaki kesitler deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirildi. Fosfat buffer salin (PBS) ile çalkalanıp endojen peroksidaz aktivitesini engellemek amacıyla % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve sonra tekrar PBS ile yıkandı. Antijenleri açığa çıkarmak için mikrodalga fırında sitrat tamponu içerisinde 10 dk ısı uygulaması yapıldı. Ardından tekrar PBS ile yıkamadan sonra spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla sekonder antikorun üretildiği türe uygun (Ultra V Blok) serumda inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra anti-GPx 1'de (abcam –ab22604) (1:1000 dilüsyon oranında) oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyonun ardından doku kesitleri yine PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorun üretildiği türe karşı olan biotinlenmiş sekonder antikor (Ultravision Detection System, Goat Anti-Rabbit, Lab Vision-510.991.2800) uygulanarak 30 dakika oda ısısında bırakıldı. Bunun ardından tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve Streptavidin horse radish peroksidaz uygulanıp oda ısısında 30 dakika daha bekletildi. Bu süre sonunda yine PBS ile yıkandıktan sonra kromojen olarak AEC (3-Amino-9-ethyl carbazole) kullanıldı. Dokulara kromojen solüsyonu eklendikten sonra mikroskopta kontrollü olarak immunoreaktivitenin oluşumuna göre reaksiyon durduruldu. Distile su ile yıkandıktan sonra zıt boyama amacıyla hematoksilin kullanıldı. Ardından AEC kromojenine uygun yapıştırıcı (Lab Vision TA-125-UG) kullanılarak kapatıldı. Preparatlar BX-051 Olympus (JAPAN) marka araştırma mikroskobunda incelendi.

Dokulardaki GPx 1 immunoreaktivitesi, boyanmanın koyuluk derecesine göre derecelendirilerek belirlendi. Derecelendirmede kullanılan semboller Tablo 3.2 'de gösterilmiştir.



**Tablo 3.2.** Dokulardaki GPx 1 immunoreaktivitesinin derecelendirilmesi

<b>Dokudaki Reaksiyon Yoğunluğu</b>	<b>Semboller</b>
Çok yoğun	3
Orta derecede yoğun	2
Az yoğun	1
Reaksiyon yok	0

Dokulardaki immunoreaktivitenin GPx 1'e spesifik olup olmadığını belirlemek amacıyla alınan doku kesitlerine, primer antikör ilave edilmeden (negatif kontrol) immunohistokimyasal teknik aynen uygulandı.

### **3.2.4. Moleküler Analiz (RT PCR)**

Moleküler analiz için, Chomczynski ve Sacchi (18) tarafından tanımlanan, guanidin isothiocyanate/phenol-kloroform metodunun modifikasyonu sonucu elde edilen Tri-Reagent (SIGMA-T9424) kullanıldı. Gen ekspresyonu için alınan karaciğer doku örnekleri (50-100 mg), 1 ml Tri-Reagent içerisinde homojenizatör yardımıyla iyice homojenize edildikten sonra +4°C'de saklandı.

#### **3.2.4.1.Total RNA İzolasyonu**

Tri-Reagent içerisindeki örnekler +4°C'de 12000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. DNA, RNA ve protein içeren süpernatant kısım 1,5 ml' lik yeni steril ependorf tüplerine alındı. Üzerine 0,2 ml kloroform ilave edip çalkalandıktan sonra oda ısısında 10-15 dakika bekletildi ve ardından +4°C'de 12000 devirde 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin sonunda tüpte üstte RNA, ortada DNA ve en altta protein içeren kısımlar olmak üzere üç tabaka görüldü. RNA içeren üstteki şeffaf kısım alttaki DNA içeren kısma dokunulmadan yeni steril ependorf tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 0,5 ml izopropanol ilave edilip 5-10 dakika oda ısısında bekletildi. Ardından +4°C'de 12000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonunda RNA pelet

şeklinde tüpün dip kısmına çökmüş oldu. Tüp içerisinde bulunan pelet dışındaki sıvı kısım atıldıktan sonra peleti yıkamak amacıyla üzerine 1 ml % 75'lik etanol ilave edildi. Daha sonra peletin yapıştığı yerden ayrılması için kısa süre vortekslendi ve hemen arkasından +4°C'de 7500 devirde 5 dakika santrifüj edilerek peletin yeniden çökmesi sağlandı. Bu işlem sonrasında tüp içerisinde bulunan etanol döküldü ve kalan alkolün iyice uzaklaşması amacıyla tüpler ağzı açık bir şekilde 5-10 dakika bekletildi. Elde edilen pelet üzerine ortalama 30-40 µl steril, nükleaz içermeyen bidistile su ilave edildi. Tüpler 55-60°C sıcaklığındaki su banyosunda 10-15 dakika bekletilerek tüpteki RNA peletinin çözündürülmesi sağlandı.

Bir mikrolitredeki RNA miktarı spektrofotometre (UVWIN 5,0- T60U) ile 260 nm dalga boyunda ölçüldü ve 3 µg RNA içeren solüsyon miktarı hesaplandı.

#### **3.2.4.2. Mesajcı RNA( mRNA)' nın Elde Edilmesi**

mRNA'ları elde etmek için, mRNA'ların çekirdekten çıkmadan önce son uçlarına çok sayıda adenin bazı (polyA kuyruğu) bağlanması özelliğinden yararlanılarak, bunlarla baz çifti kurabilen Oligo dT primerleri kullanıldı. Oligo dT primerlerinin en iyi çalıştığı ısı 70°C' dir (53). Her örnek için 3 µg RNA içeren solüsyon miktarı üzerine 2 µl Oligo dT (Promega-C1101) ve son hacim 15 µl olacak miktarda nükleaz içermeyen (NF) su ilave edildi. Bu örnekler PCR cihazında (BioRad MJ Mini), 70°C'de 5 dakika ve 4°C'de en az 2 dakika tutularak mRNA'lar elde edildi.

#### **3.2.4.3. Tamamlayıcı (komplementer) DNA (cDNA ) Elde Edilmesi**

Elde edilen mRNA'lardan tamamlayıcı DNA (cDNA ) elde etmek için öncelikle dNTP set ve MMLV karışımı hazırlandı. dNTP set (SIGMA-DNTP100) içerisinde dört adet baz içeren 4 adet tüp vardır. Bazlardan 10mM konsantrasyonda çalışma solüsyonu hazırlamak üzere her bir bazdan 40'ar µl alınarak yeni tüplere koyuldu. Bu dört tüpün her birinin üzerine 60 µl NF su

koyuldu ve vortekslendi. Bundan sonra sulandırılmış olan her bir bazdan 25'er µl alınarak tek bir tüpte karıştırılıp dNTP set hazırlandı.

MMLV karışımı ise her bir örnek için; 1,6 µl MMLV-RT enzimi (M1701-PROMEGA) ve 8 µl MMLV-RT enzim bufferı, 8 µl dNTP, 1 µl rRNA'sin (N2511-PROMEGA), 6,4 µl NF su olmak üzere toplam 25 µl hacimde hazırlandı. Hazırlanan master mix, mRNA içeren tüplerin üzerine ilave edildikten sonra PCR cihazında; 37°C'de 1 saat, 95°C'de 5 dakika ve 4°C 'de en az 2 dakika olacak şekilde tutuldu. Bu program sonunda cDNA elde edilmiş oldu. Programdan çıkan örnekler -20°C'de muhafaza edildi.

#### **3.2.4.4. DNA'nın çoğaltılması**

Daha önce elde etmiş olduğumuz cDNA'ları çoğaltıp, aradığımız geni bulmak üzere, gene özgü primerler ve bu primerleri içeren bir karışım hazırlandı. GPx 1 geni için baz dizilimleri forward; 5'-CCT CAA GTA CGT CCG ACC TG-3', reverse; 5'-CAA TGT CGT TGC GGC ACA CC-3' (26), β-aktin geni için ise forward; 5'-TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT-3', reverse; 5'-CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG-3' (38,71), primerleri kullanıldı. Liyofilize primerler 500 µl NF su ile sulandırıldı. Her örnek için;

1 µl Taq DNA polimeraz enzimi (SIGMA- D1806)

5 µl Taq buffer

1 µl dNTP

1 µl Forward (ileri) primer

1 µl Reverse (geri) primer karıştırıldı ve NF su ile 50 µl'ye tamamlandı.

Hazırlanan bu karışım, steril PCR tüplerine 50'şer µl hacimde koyuldu. Üzerlerine 2 µl cDNA ve buharlaşmayı önlemek için 2 µl mineral yağ ilave edildikten sonra PCR cihazına koyuldu.

PCR cihazında;

1. 94 °C' de 5 dakika
2. 50 °C' de 1 dakika
3. 72 °C de 1,5 dakika
4. 94 °C' de 1 dakika
5. 50 °C' de 1 dakika
6. 3. adımı dönölüp 5. adıma kadar GPx 1 için 28 kez,  $\beta$ -aktin için 30 kez tekrarlandı
7. 72 °C' de 10 dakika
8. 4 °C'de en az 2 dakika olmak üzere süresiz bekletildi.

Siklus sayısı, yapılan denemeler sonucunda GPx 1 geni için 28 siklus,  $\beta$ -aktin geni için ise 30 siklus olarak belirlendi. Elde edilen ürünler -20 °C' de saklandı.

#### **3.2.4.5. Örneklerin Jelde Yürütülmesi**

Elde ettiğimiz PCR ürünleri % 1,5' lik agaroz jelde yürütüldü. Bunun için; 3,75 g agaroz (SIGMA-A5093), 245 ml TBE (Tris-Borate-EDTA) içerisinde mikrodalga fırında ortalama 5 dakika süre ile içerisinde hiç tortu kalmayacak şekilde eritildi. Eritilen agar biraz soğuduktan sonra içerisine 5  $\mu$ l ethidium bromide ilave edildi ve daha sonra tarakların bulunduğu kalıba döküldü. Katılaşması için oda ısısında 10-15 dakika bekletildi. Daha sonra taraklar çıkarıldı ve içi TBE ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Sonra, PCR cihazından aldığımız son ürünlerden yeni tüplere 10'ar  $\mu$ l koyuldu. Ayrıca başka bir tüpe de 6  $\mu$ l DNA cetveli (PROMEGA-G2101, 100 bp DNA ladder) koyuldu. Bütün tüpler üzerine 2  $\mu$ l yükleme boyası koyularak sırayla tarakların çıkarıldığı kuyucuklara yüklendi. Bundan sonra örnekler elektroforez cihazında (E-C Apparatus Corp.-Ec 3000p) 100 volt'ta 1 saat süreyle yürütüldü. Sonuçlar UV ışığı altında fotoğraflandı (Sanyo-Xacti 6 Mp E60).

$\beta$ -aktin ve GPx 1 ürünlerine ait bantların dansitometrik ölçümleri Kodak MI Ready programında yapıldı. GPx 1'e ait dansitometrik bulgular  $\beta$ -aktin'e göre normalize edilerek istatistiksel analizleri yapıldı.

### **3.2.5. İstatistiksel Analiz**

İstatistik analiz için Minitab programının (49,69) 12.1 versiyonu kullanıldı. Gruplar arası farklılıklar için one-way ANOVA testi, çoklu gruplar arasındaki farkın kaynağını bulmak için çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey testi uygulandı (36,69). İstatistiksel analizde güven aralığı 0,05 olarak belirlendi.

## 4. BULGULAR

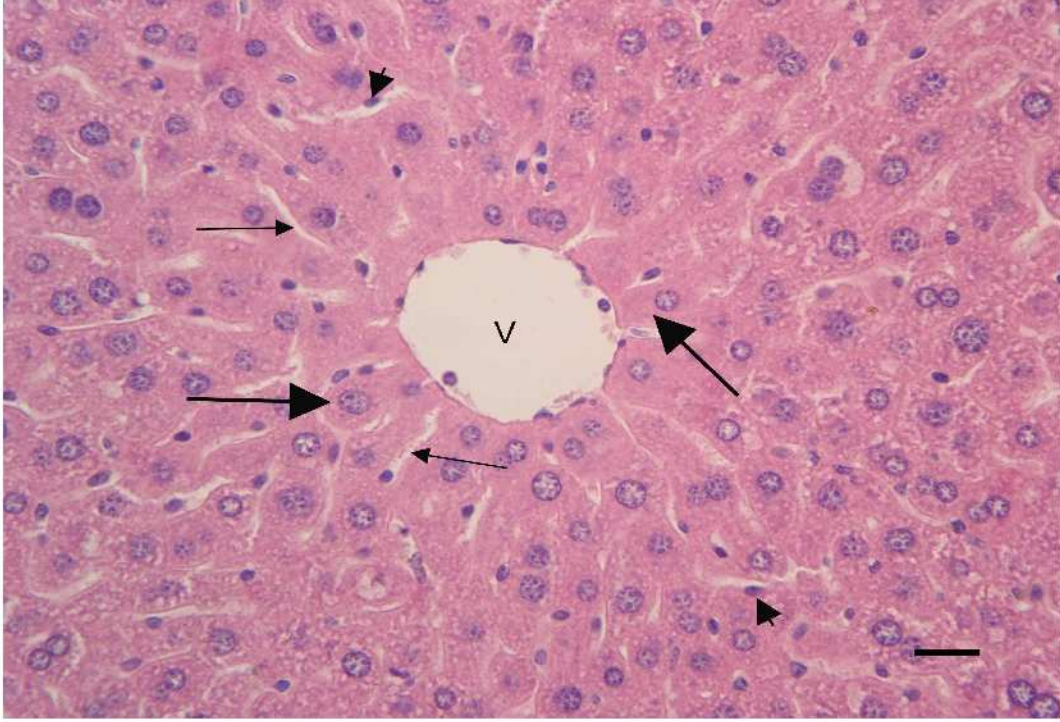
### 4.1. Histolojik Bulgular

Kontrol grubu farelerin karaciğerlerini dıştan bağıdokudan bir kapsülün çevrelediği, kapsülden içeriye doğru bağıdokunun yayıldığı fakat lopçukların belirgin olmadığı, doku içerisinde vena sentralisler ile vena sentralislerin etrafında ışınsal tarzda dizilim göstererek Remark kordonlarını oluşturan hepatositler belirgin olarak gözlemlendi.

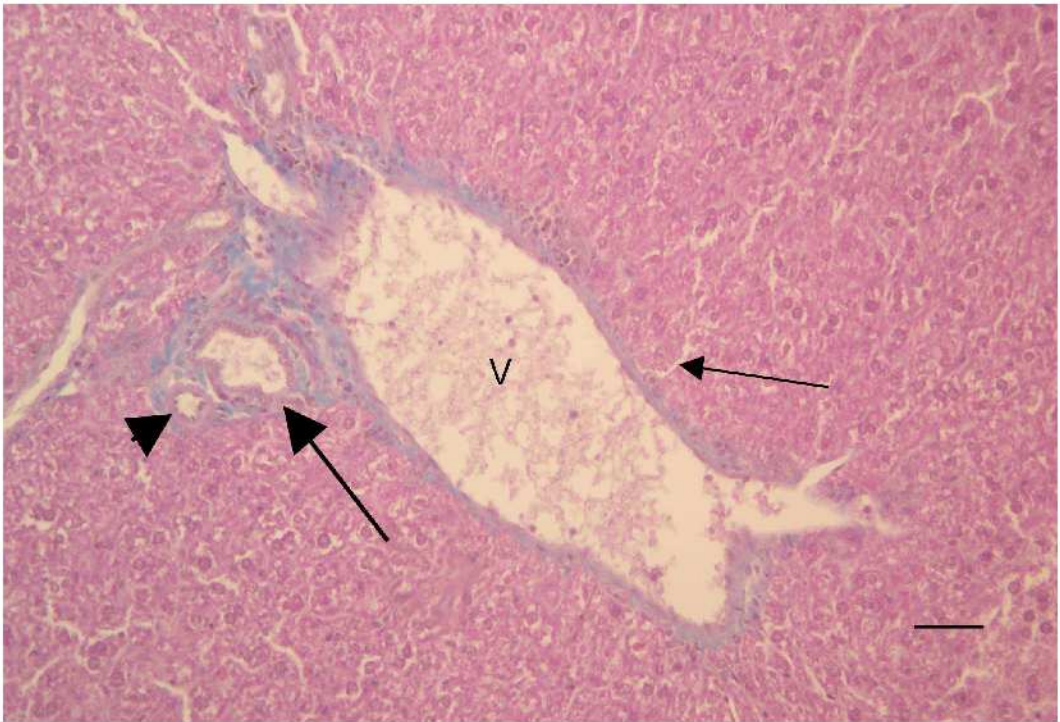
Hepatositler, çift çekirdekli ovalimsi olmakla birlikte genellikle iri ve yuvarlak şekilli, merkezi konumda genellikle bir bazen de çift çekirdeğe sahip, pembe sitoplazmalı olarak görüldü. Hepatosit kordonları arasındaki genişlemiş kan damarları olan sinüzoidlerin duvarında ise endotel hücrelerinin bulunduğu, ayrıca yine bu alanlarda fagositozdan sorumlu olan Kupffer hücrelerinin yer aldığı gözlemlendi (Resim 4.1).

Portal alanlarda ise karaciğer üçlüsü olarak adlandırılan arteriya hepatica, vena interlobularis ile safra kanalı duktus biliferus görüldü (Resim 4.2).

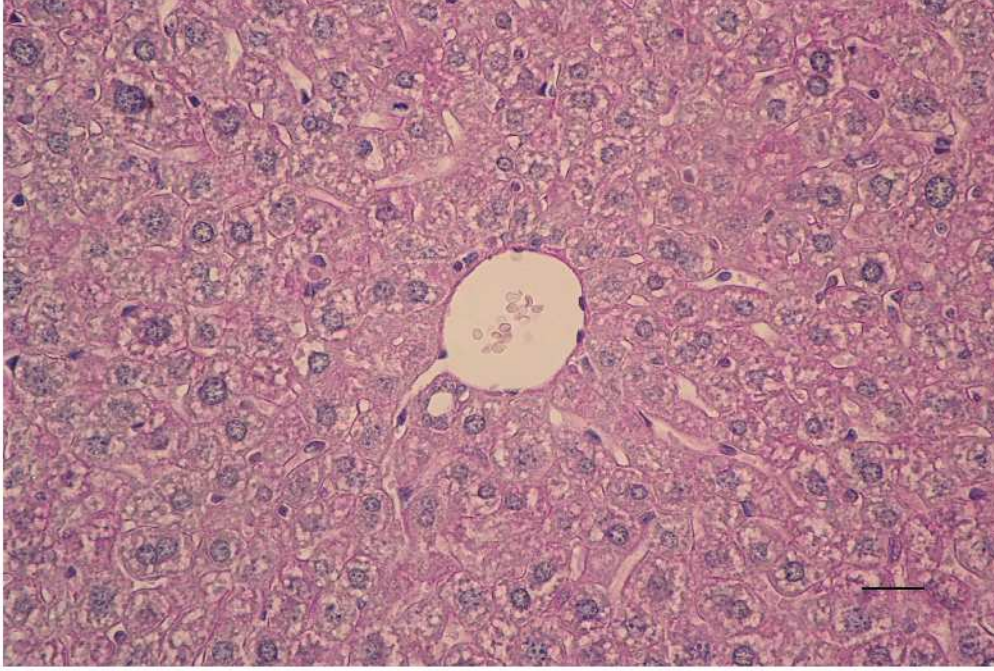
Yapılan PAS boyaması sonucunda, hepatositlerin sitoplazmalarında pembe-kırmızı renkte boyanan glikojen birikimleri belirlendi (Resim 4.3).



**Resim 4.1.** Kontrol grubu farelerde karaciğerin genel görünümü. V: Vena sentralis, İnce ok: Sinüzoid, Kalın ok: Hepatosit, Ok başı: Kupffer hücreleri. H.E. Bar: 50  $\mu$ m.

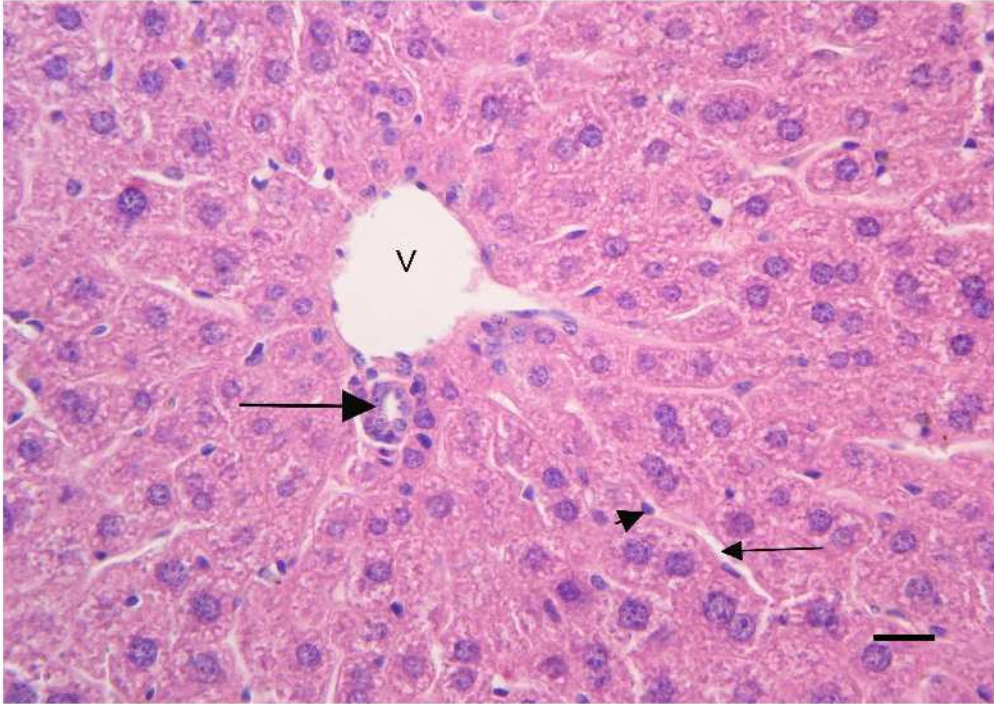


**Resim 4.2.** Kontrol grubu fare karaciğerinin Kiernan aralığı bölgesi histolojik görünümü. V: Vena interlobularis, İnce ok: Sinüzoid, Kalın ok: Duktus biliferus. Ok başı: Arteriya hepatica. Triple boyama. Bar: 100  $\mu$ m.



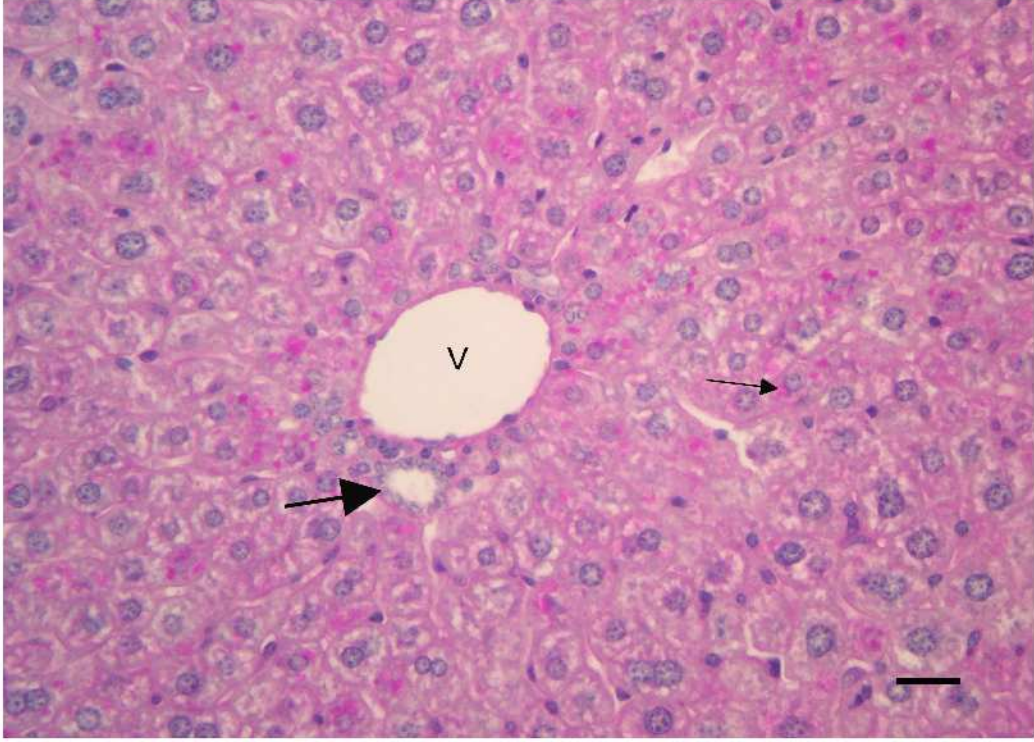
**Resim 4.3.** Kontrol grubu karaciğer dokusunda glikojen birikimi. PAS. Bar: 50  $\mu$ m.

Rutin histolojik boyamalarla sham grubu farelerin karaciğerlerinde yapısal olarak kontrol grubundan farklı hiçbir bulguya rastlanmadı (Resim 4.4, 4.5).



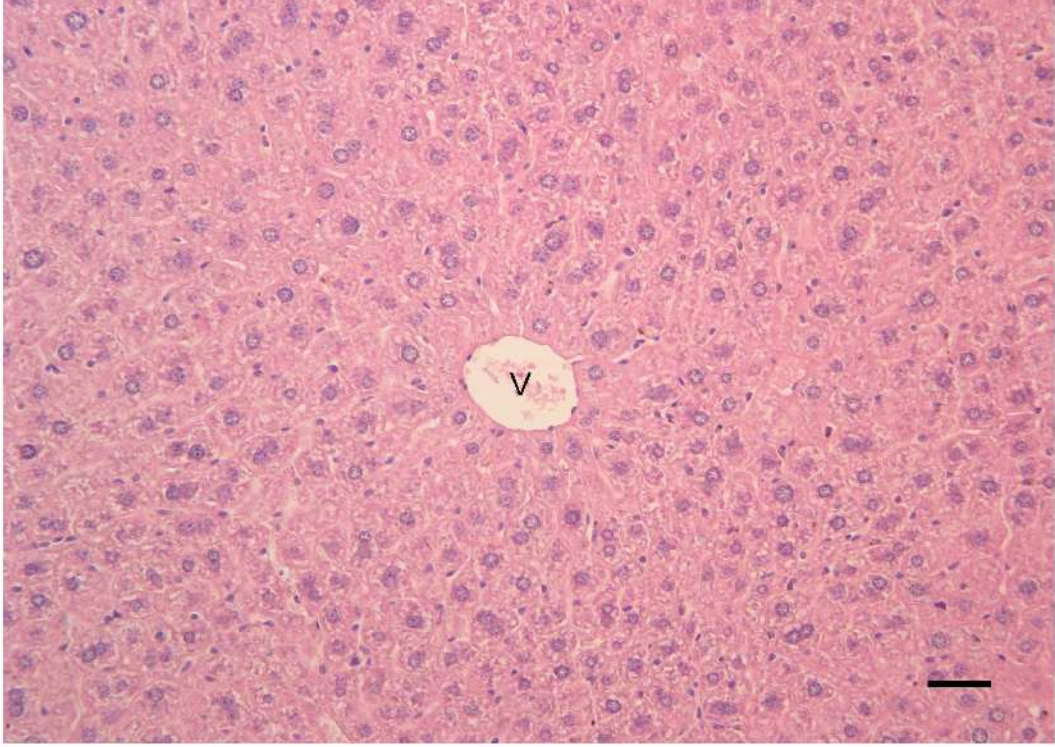
**Resim 4.4.** Sham grubu karaciğer dokusu. V: Vena interlobularis, İnce ok: Sinüzoid, Kalın ok: Duktus biliferus, Ok başı: Kupffer hücresi. HE. Bar: 50  $\mu$ m.



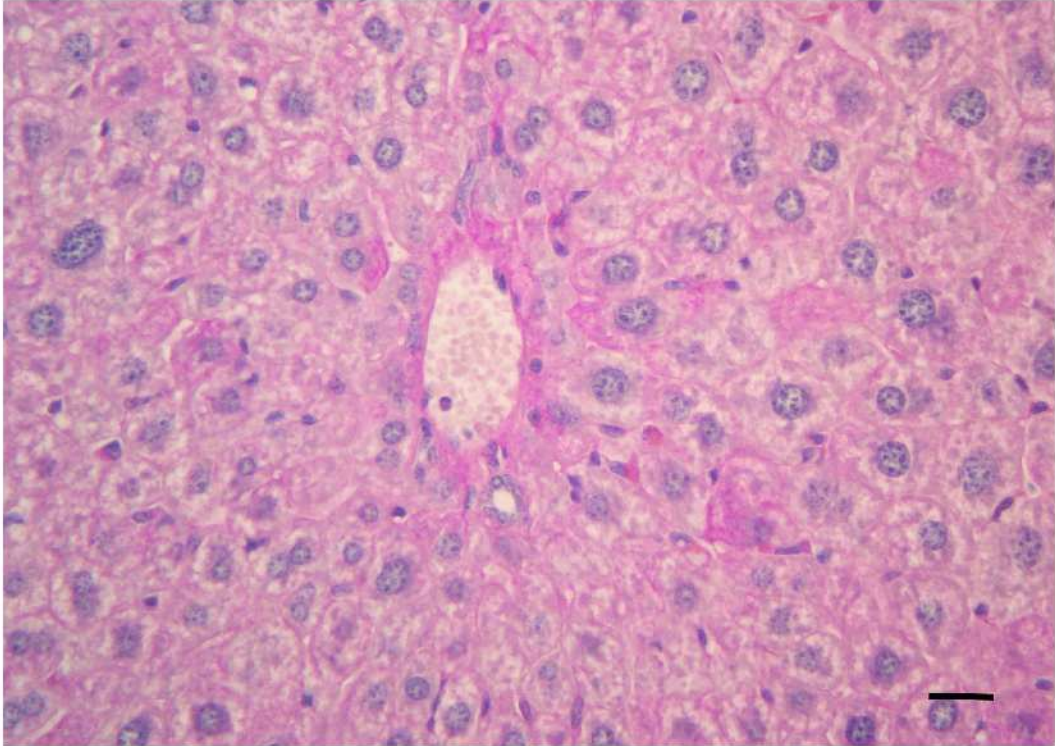


**Resim 4.5.** Sham grubu karaciğer dokusunda glikojen birikimi. V: Vena interlobularis, Kalın ok: Duktus biliferus, İnce ok: Glikojen birikimi görülen hepatosit. PAS. Bar: 50  $\mu$ m.

Deneme grubuna ait fare karaciğerlerinde de kontrol ve sham grubu karaciğer dokularıyla benzer bulgular gözlemlendi farklı hiçbir bulguya rastlanmadı (Resim 4.6, 4.7).



**Resim 4.6.** Deneme grubu karaciğer dokusunun histolojik görünümü. V: Vena sentralis. HE.  
Bar: 100 µm.



**Resim 4.7.** Deneme grubu karaciğer dokusunda glikojen birikimi. PAS. Bar: 50 µm.

## 4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

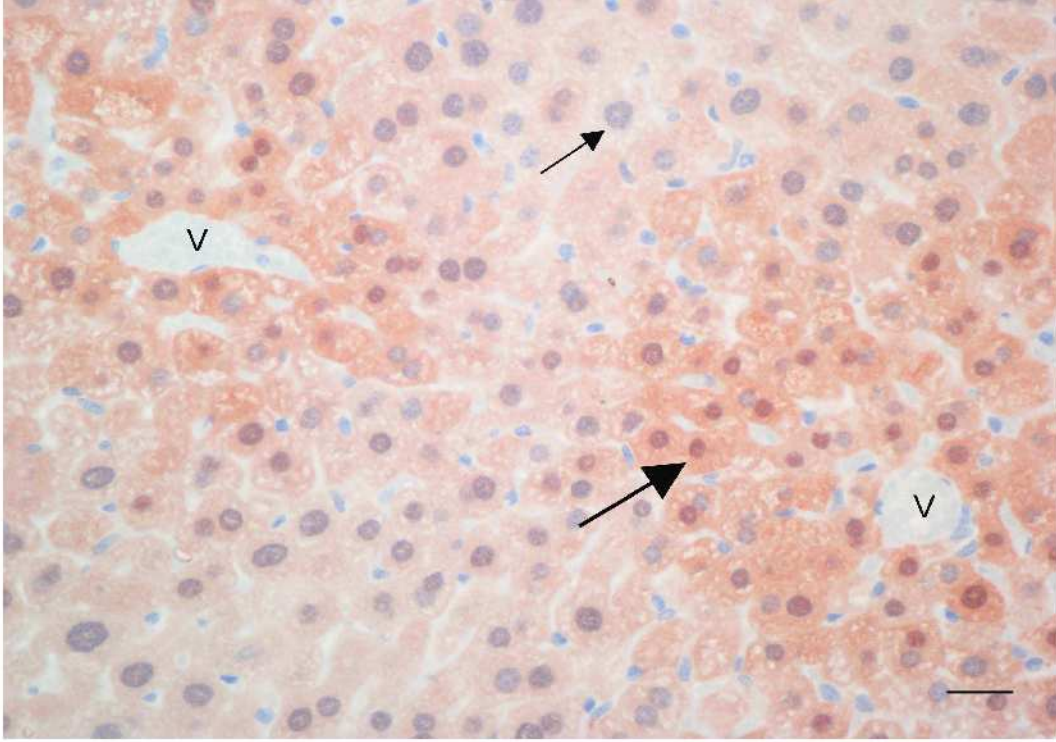
Deneme, kontrol ve sham gruplarına ait farelerin karaciğer kesitleri GPx 1 enziminin karaciğerdeki immunohistokimyasal lokalizasyonu yönünden ışık mikroskopik olarak incelendi. Tüm gruplarda GPx 1 immunoreaktivitesinin spesifik olduğu görüldü.

Kontrol grubuna ait karaciğer doku örneklerinin immunohistokimyasal incelemesinde, Glisson kapsülünde, diğer bağdoku alanlarında, endotel hücrelerinde, Kupffer hücrelerinde ve duktus biliferusta immunoreaktivitenin olmadığı gözlemlendi. Dokularda, 0'dan 3'e kadar değişen değerlerde reaksiyon yoğunluğu görülen hepatositlere rastlandı. GPx 1 immunoreaktivitesinin bazı hepatositlerde sadece sitoplazmik, çoğunlukla da hem sitoplazmik hem de nükleer tarzda olduğu, çok az sayıda rastlanan bazı hepatositlerde ise hiç reaksiyon olmadığı gözlemlendi. Doku örneklerinde çift çekirdekli hepatositlerin bazılarında çekirdeğin birinin reaksiyon verdiği diğerinin ise reaksiyon vermediği görüldü. Yapılan incelemelerde immunoreaktivitenin özellikle Kiernan aralığı ile vena sentralisler etrafındaki hepatositlerde kuvvetli olduğu, bu alanların dışındaki kısımlarda daha zayıf reaksiyon verdiği saptandı. (Resim 4.8, 4.9).

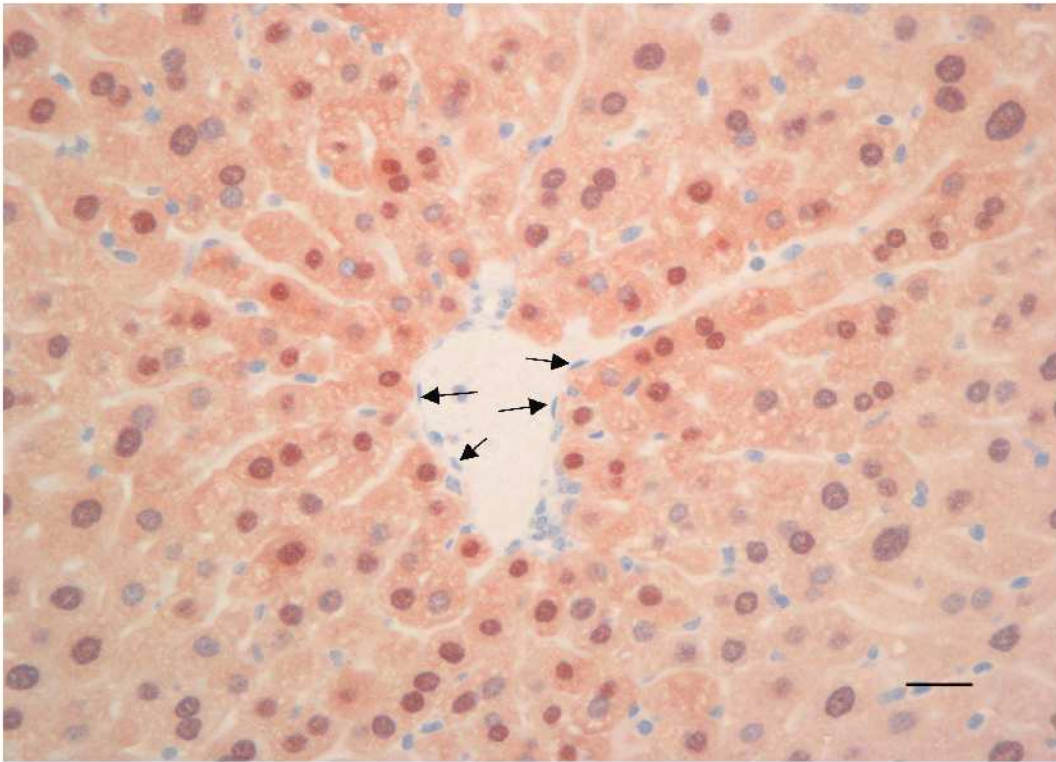
Karaciğerdeki yapılarda bulunan reaksiyon yoğunlukları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.** Karaciğerdeki yapılar ve reaksiyon yoğunluğu.

<b>Karaciğerdeki yapılar</b>	<b>Reaksiyon yoğunluğu</b>
Glisson kapsülü (bağ doku)	0
Endotel hücreleri	0
Kupffer hücreleri	0
Duktus biliferus	0
Kiernan aralığı çevresindeki hepatositler	+3
Vena sentralis çevresindeki hepatositler	+3
Diğer alanlardaki hepatositler	0, +1, +2

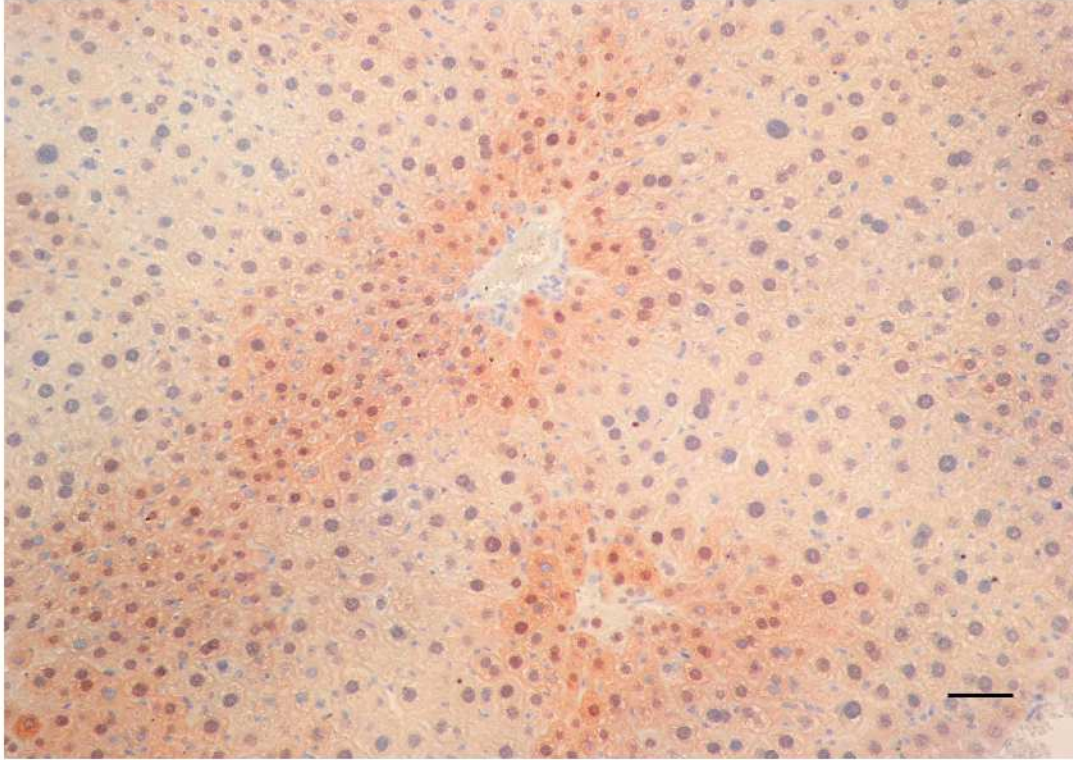


**Resim 4.8.** Kontrol grubu karaciğer dokusunda vena sentralisler etrafında GPx 1 immunoreaktivitesi. V: Vena sentralis, Kalın ok: Yoğun immunoreaktivite, İnce ok: Zayıf immunoreaktivite. Bar: 50  $\mu$ m.



**Resim 4.9.** Kontrol grubuna ait dokuda GPx 1 immunoreaktivitesi. (Oklar: Endotel hücreleri). Bar: 50  $\mu$ m.

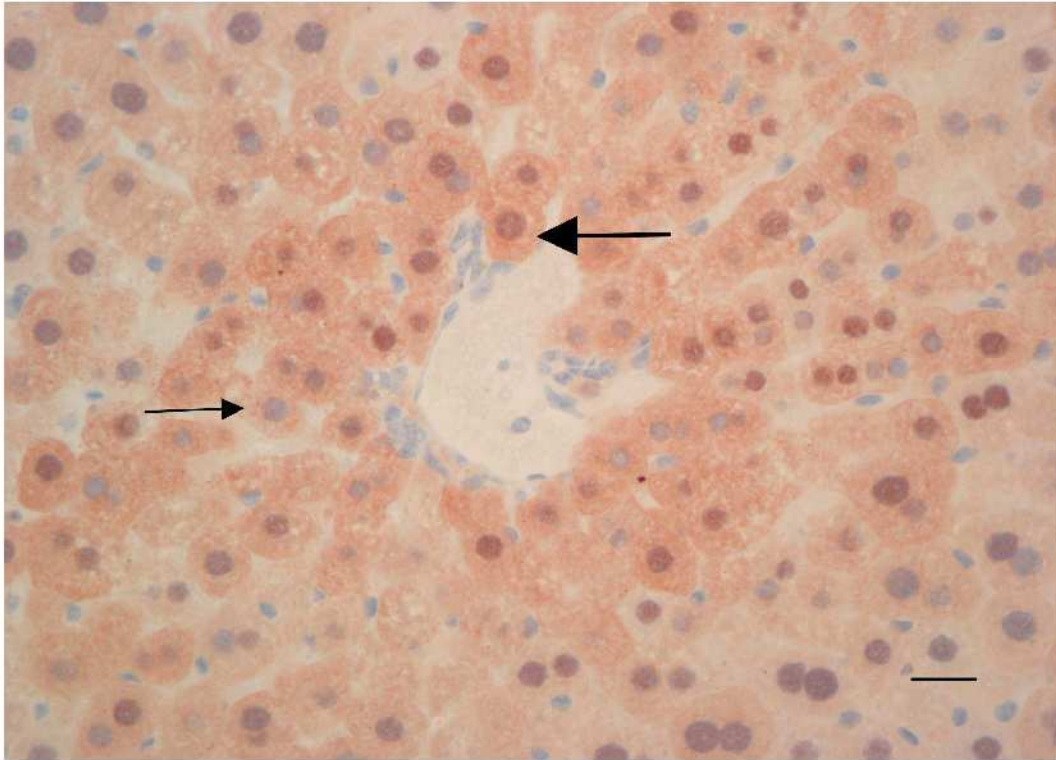
Sham grubuna ait farelerin karaciğer doku kesitlerinde de, hepatositlerde GPx 1 immunoreaktivitesinin hem sitoplazmik hem de nükleer tarzda olduğu, az sayıda da olsa sadece sitoplazmik boyanan hepatositlerin de olduğu görüldü. Nadiren de olsa hiç reaksiyon vermeyen hepatositlere rastlanırken, çift çekirdekli hepatositlerin bazılarında, çekirdeklerin birinin reaksiyon verdiği, diğerinin ise reaksiyon vermediği görüldü. Yine, Kiernan aralığı ile vena sentralisler etrafındaki birkaç sıra hepatositte GPx 1 immunoreaktivitesinin diğer alanlara göre daha yoğun olduğu dikkati çekmesine karşın bağı dokü alanları, duktus biliferus, Kupffer hücreleri ile endotel hücrelerinde GPx 1 immunoreaktivitesinin olmadığı görüldü (Resim 4.10).



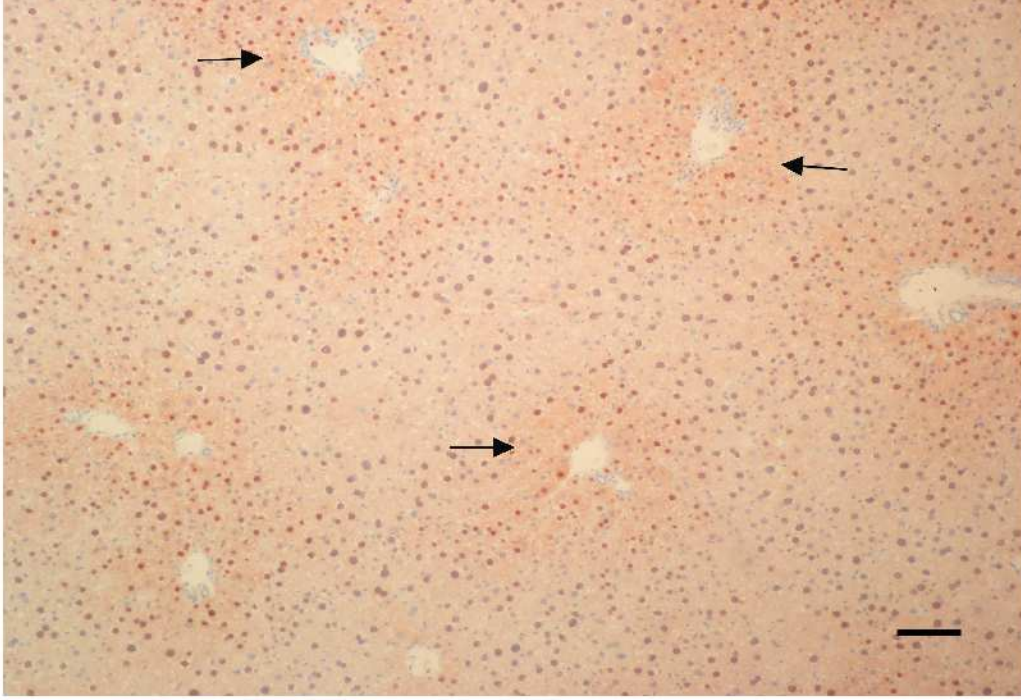
**Resim 4.10.** Sham grubu karaciğer dokusunda GPx 1 immunoreaktivitesi. Bar: 100 µm.

Deneme grubu karaciğer doku örneklerinde yapılan incelemelerde, GPx 1 enziminin immunohistokimyasal dağılımının kontrol ve sham gruplarına ait doku örnekleriyle benzer şekilde olduğu görüldü. Deneme grubuna ait karaciğer kesitlerinde de GPx 1 enziminin hüresel dağılımı hem sitoplazmik hem de nükleer olarak, GPx 1'in doku içerisindeki lokalizasyonunun ise

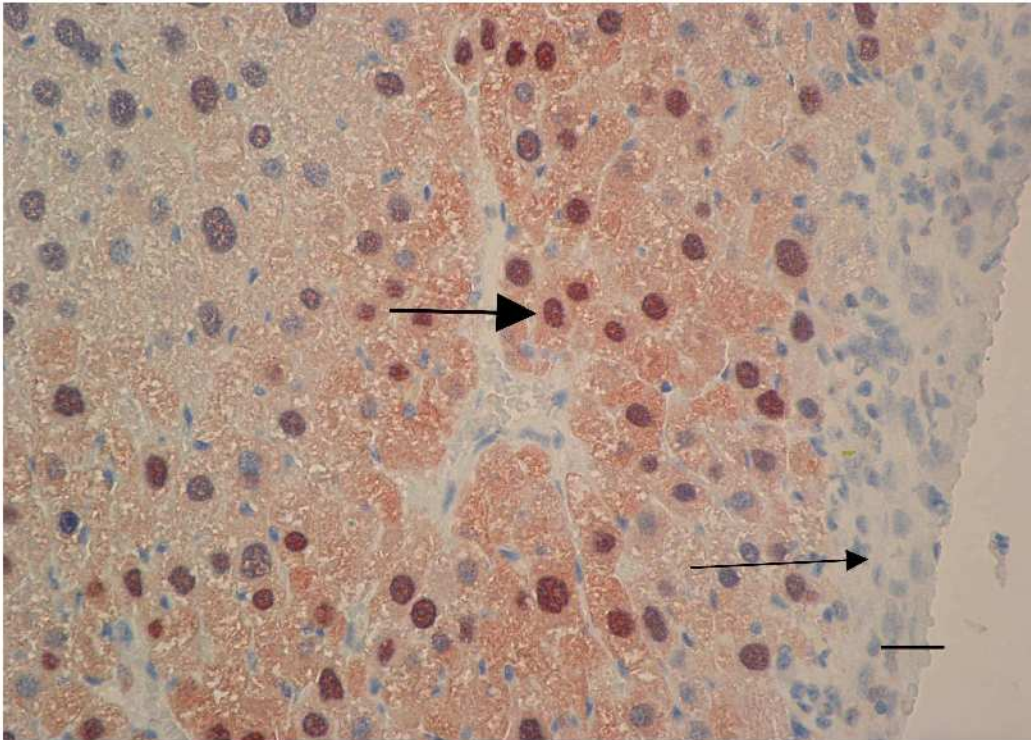
kontrol ve sham gruplarında olduğu gibi, portal alanlar çevresinde daha yoğun olduğu görüldü. Diğer gruplarda olduğu gibi, bu gruba ait doku örneklerinde de çift çekirdekli hepatositlerin bazılarında çekirdeğin birinin reaksiyon verdiği, diğerinin ise reaksiyon vermediği görüldü. Yine bağ doku alanları, endotel hücreleri, Kupffer hücreleri ile duktus biliferusta immunohistokimyasal reaksiyonun görülmemesi de diğer gruplarla ortak bulgular arasındaydı. Ayrıca, karaciğeri saran hepatik kapsülde de GPx 1 immunoreaktivitesinin olmadığı dikkati çekti. Bu gruba ait örneklerde de aynı doku içerisinde 0'dan 3'e kadar değişen değerlerde reaksiyon yoğunluğu görülen hepatositlere rastlandı (Resim 4.11, 4.12, 4.13, 4.14).



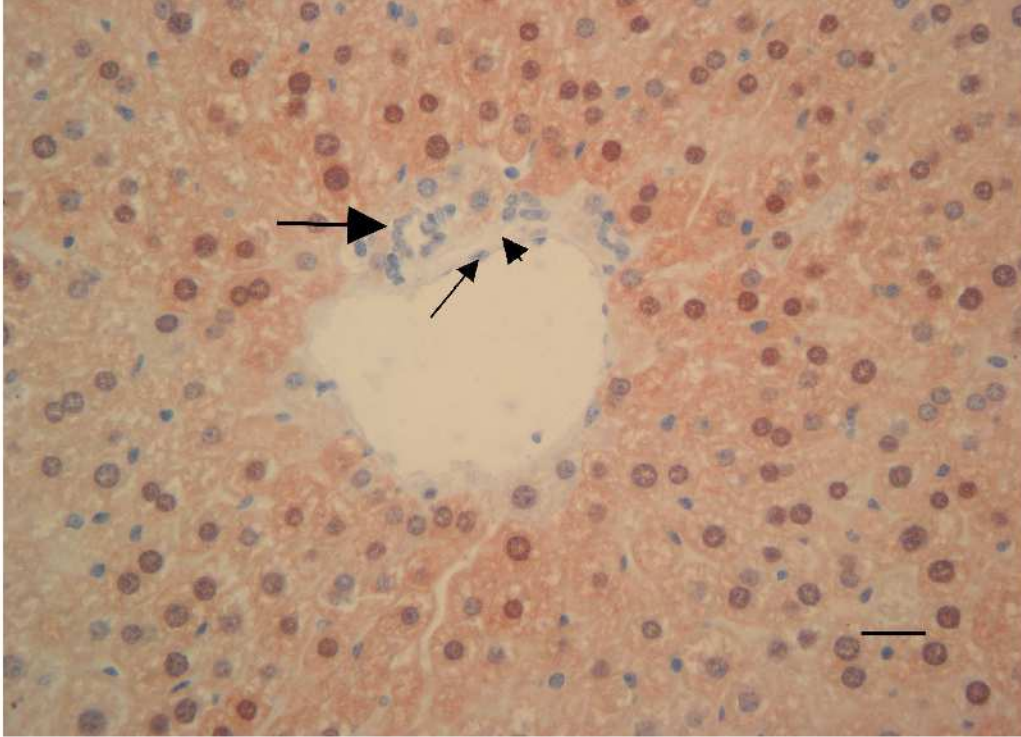
**Resim 4.11.** Deneme grubu hepatositlerde sitoplazmik ve nükleer GPx 1 immunoreaktivitesi. Kalın ok: Sitoplazmik ve Nükleer GPx 1 İmmunoreaktivitesi, İnce ok: Sitoplazmik GPx 1 İmmunoreaktivitesi. Bar: 50  $\mu$ m.



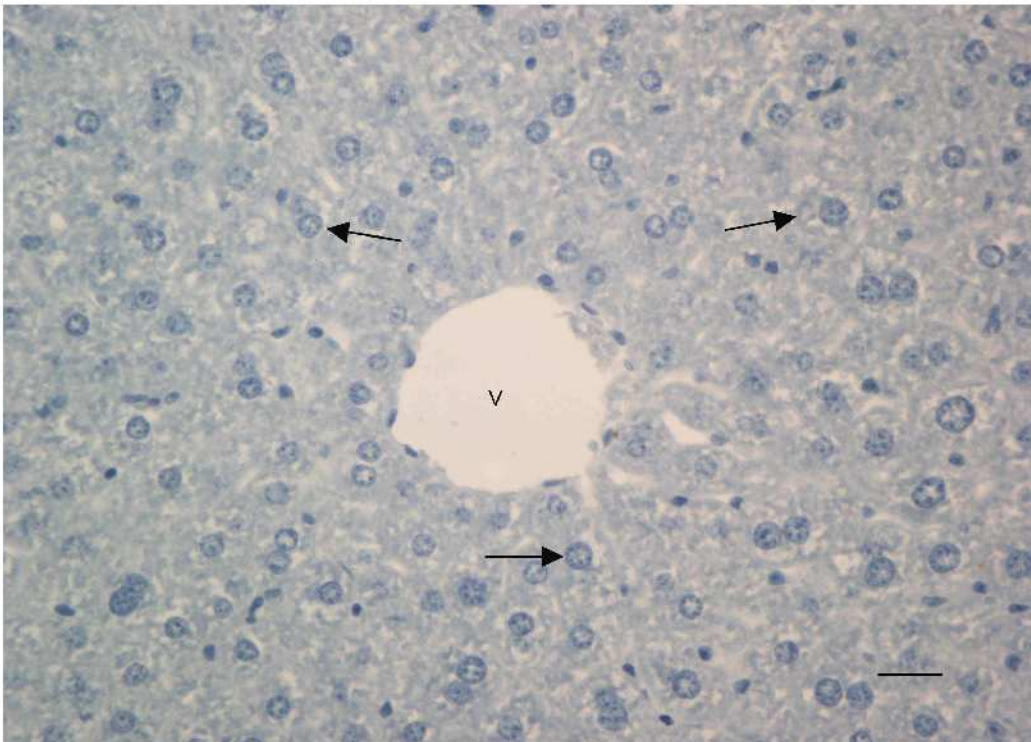
**Resim 4.12.** Deneme grubu karaciğer dokusunda GPx 1 immunoreaktivitesi. Oklar: Yoğun immunoreaktivite odakları. Bar: 200  $\mu$ m.



**Resim 4.13.** Deneme grubunda GPx 1 immunoreaktivitesinin durumu. Kalın ok: Hepatositlerde pozitif immunoreaktivite, İnce ok: Karaciğer kapsülünde negatif immunoreaktivite. Bar: 50  $\mu$ m.



**Resim 4.14.** Deneme grubuna ait dokuda Kiernan aralığında GPx 1 immunoreaktivitesi. Ok başı: Bağ doku, İnce ok: Damar endoteli, Kalın ok: Duktus biliferus. Bar: 50  $\mu$ m.



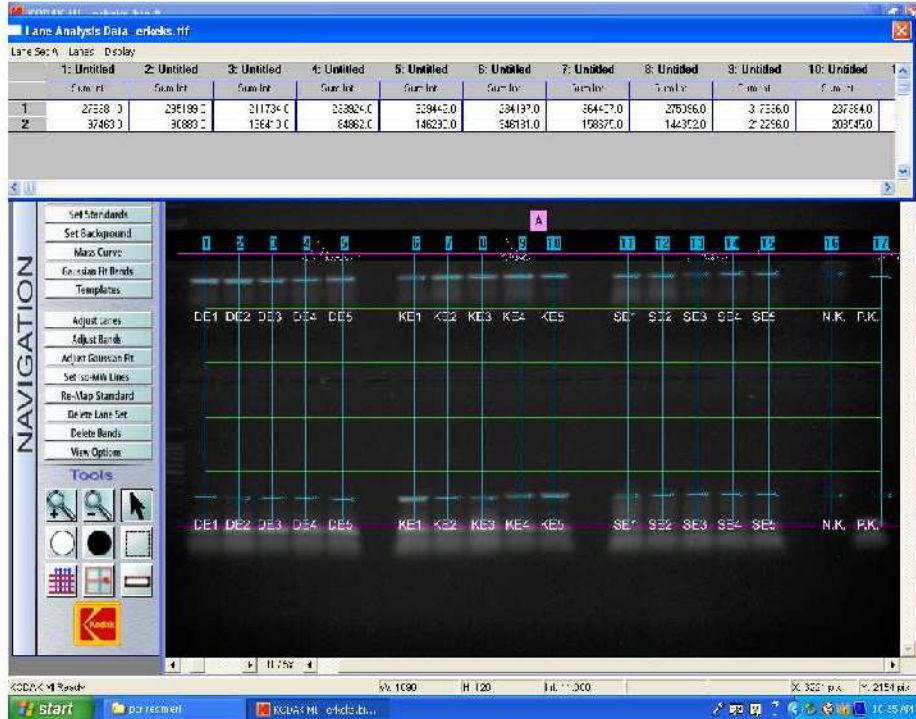
**Resim 4.15.** Deneme grubu karaciğer dokusunda (Primer antikor koyulmayan) negatif GPx 1 immunoreaktivitesi (Negatif kontrol). V: Vena sentralis. Oklar: Hepatositler. Bar: 50  $\mu$ m.



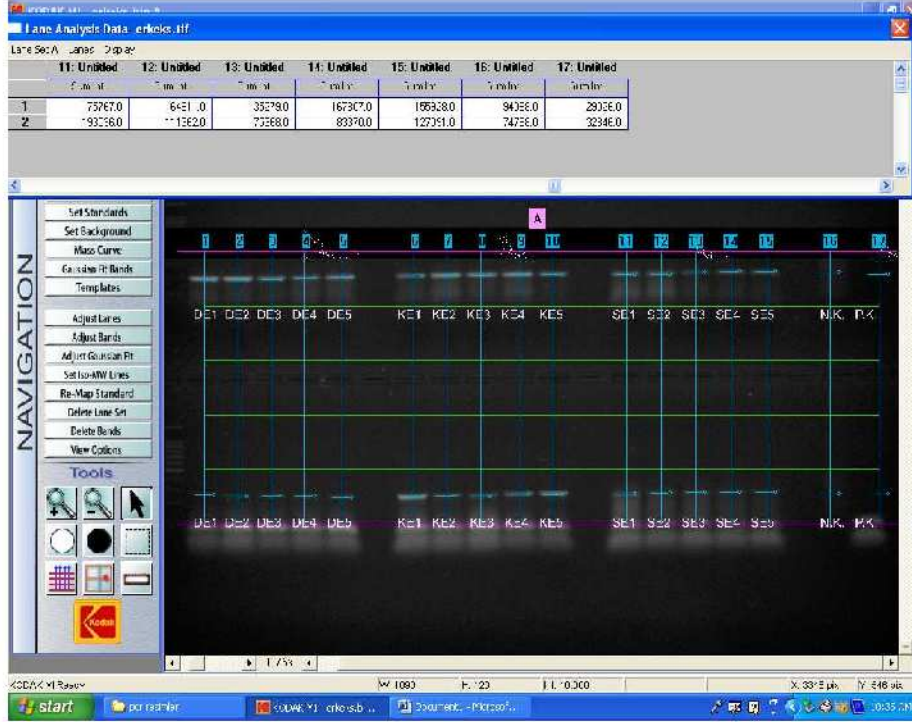
Tüm gruplardan alınan karaciğer kesitlerinde GPx 1 immunoreaktivitesinin spesifik olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılan negatif kontrollerde GPx 1 immunoreaktivitesinin olmadığı gözlemlendi (Resim 4.15).

### 4.3. Moleküler Analiz Bulguları

Melatonin uygulamasının karaciğer dokusunda Glutasyon peroksidaz'ın gen ekspresyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla deneme, kontrol ve sham gruplarına ait olan karaciğer örneklerinin moleküler analizleri yapıldı. Yapılan moleküler analiz sonuçları dansitometrik olarak ölçülerek bant yoğunluklarına göre sayısal veriler elde edildi ve değerlendirildi. Deneme, kontrol ve sham gruplarına ait olan karaciğer örneklerinde GPx 1 enzim geninin ekspresyon düzeyi, RT PCR yöntemi ile kontrol geni olan  $\beta$ -aktin genine göre normalize edilerek belirlendi. Bunun sonucunda elde edilen verilerle (Resim 4.16,4.17) gruplar arasında karşılaştırmalar yapıldı.



Resim 4.16. RT PCR sonuçlarının dansitometrik ölçüm sonuçları.



Resim 4.17. RT PCR sonuçlarının dansitometrik ölçüm sonuçları (Devamı).

Yapılan moleküler analizler sonucunda deneme grubuna ait GPx 1 geni ekspresyon düzeyi  $2,528 (\pm 0,291)$ , kontrol grubuna ait GPx 1 geni ekspresyon düzeyi  $1,496 (\pm 0,284)$ , sham grubuna ait GPx 1 geni ekspresyon düzeyi ise  $1,478 (\pm 0,198)$  olarak bulundu.

Karaciğer dokusunda GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin deneme, kontrol ve sham grupları arasındaki karşılaştırılması Tablo 4.2 'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.** Karaciğerde GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin gruplar arası karşılaştırılması.

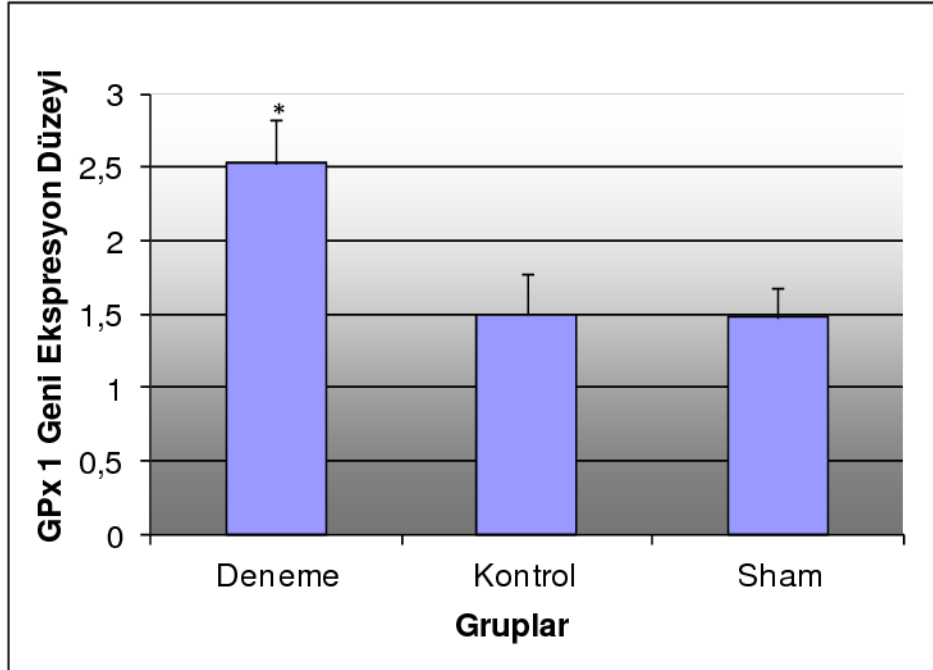
Gruplar	n	GPx 1 Geni Ekspresyon Düzeyi ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ )	F
Deneme	5	2,528 $\pm$ 0,291 <sup>a</sup>	5,31*
Kontrol	5	1,496 $\pm$ 0,284 <sup>b</sup>	
Sham	5	1,478 $\pm$ 0,198 <sup>b</sup>	

P= 0,022, \*P<0,05

$\bar{x}$ : Ort.değer, S $\bar{x}$ : Standart hata

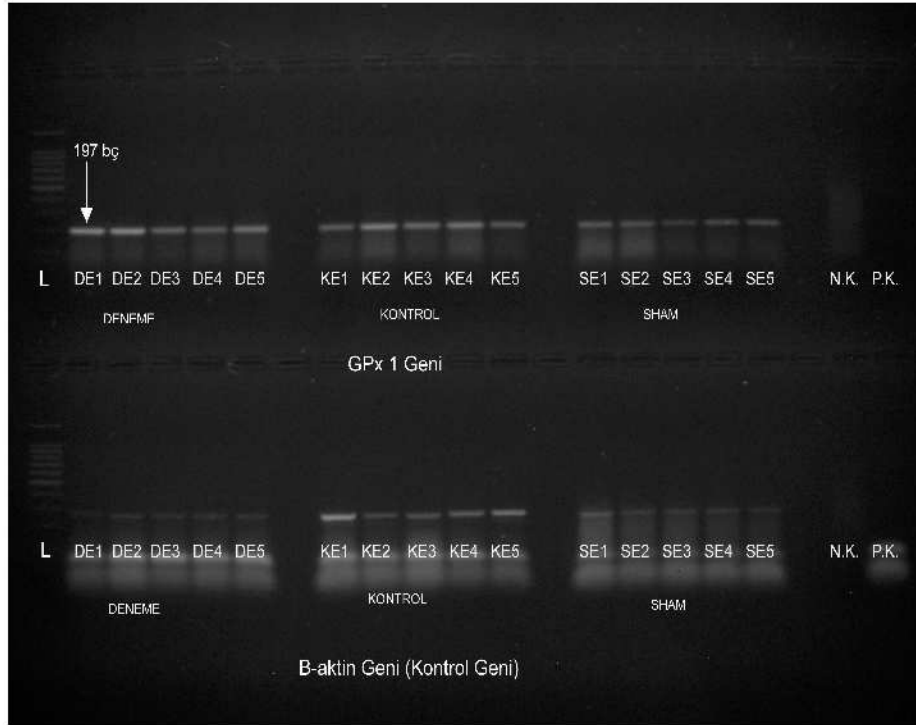
GPx 1 geninin karaciğerdeki ekspresyon düzeyinin gruplar arası ortalamalarının karşılaştırılması Grafik 4.1 'de de gösterilmiştir.

**Grafik 4.1.** GPx 1 geni ekspresyon düzeyinin ortalamalarının gruplar arası karşılaştırılması



Yaptığımız bu çalışmada, karaciğer dokusunda GPx 1 geni ekspresyon düzeyi açısından gruplar arası yapılan incelemede, kontrol ve sham grupları arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulunmazken, deneme grubunda kontrol ve sham grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlı ( $P<0,05$ ) bir artış olduğu belirlendi.

Tüm gruplara ait RT PCR sonuçları Resim 4.18 'de gösterilmiştir.



**Resim 4.18.** GPx 1 geni RT PCR sonuçları ( L: 100 bp DNA ladder, N.K.: Negatif kontrol, P.K.: Pozitif kontrol, Ürün büyüklüğü: 197 baz çifti).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, son yıllarda önemi oldukça artan antioksidan maddelerden biri olan melatoninin ekzojen uygulamasının organizmadaki antioksidan savunma sisteminin önemli bir elemanı olan Glutasyon peroksidaz 1 (GPx 1) enzimine etkisini gözlemlemek amaçlanmıştır. Bu amaçla, erişkin erkek farelere 4 hafta boyunca her gün melatonin uygulanmış ve sonra karaciğer dokusu histolojik olarak incelenmiş, Glutasyon peroksidaz 1 (GPx 1) enziminin karaciğerde immunohistokimyasal lokalizasyonu ve bu enzimin karaciğerdeki gen ekspresyonu araştırılmıştır.

Melatoninin çeşitli etkilerini incelemek için yapılan çalışmalarda farklı doz ve sürelerde melatonin uygulaması yapıldığı görülmüştür. Mauriz ve arkadaşları (45) genç ve yaşlı rat karaciğerlerinde melatoninin antioksidan enzimlerin gen ekspresyonu ve aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla 4 hafta boyunca 20 mg/L dozunda içme sularına melatonin katmışlardır. Çolakoğlu ve arkadaşları (21) sigaranın karaciğerde oluşturduğu yapısal değişiklikler üzerine melatonin ve C vitamininin etkilerini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada ratlara 3 ay boyunca 4 mg/kg (i.p.) dozda melatonin uygulamışlardır. Schaffazick ve arkadaşları (64) çalışmalarında erkek farelere 1 ve 10 mg/kg (i.p.) melatonin uygulamışlardır. Farklı bir çalışmada Kuş ve arkadaşları (40) 2 hafta süresince erkek ratlara 25 mg/kg (i.p.) melatonin uygulaması yapmışlardır. Yine başka bir çalışmada (67) farelere 20 mg/kg dozda 5-10 gün süreyle melatonin uygulaması yapılmıştır. Literatürlerde hayvan türleri açısından özellikle rat ve fare arasında melatonin dozu açısından belirgin bir fark dikkati çekmemiştir (15,22,64). Lankoff ve arkadaşları (41) fare karaciğerinde nodularinin sebep olduğu oksidatif strese karşı melatoninin koruyucu etkisini ve antioksidan enzim aktivitesine etkisini incelemek için çeşitli dozlarda melatoninini (5, 10, 15 mg/kg) intraperitoneal yolla uygulamışlardır.

Bizim yaptığımız bu çalışmada melatonin dozu çalışmalarda en çok karşılaşılan (7,15,22,27,64) doz olan 10 mg/kg olarak belirlenmiş ve intraperitoneal yolla 4 hafta boyunca her gün uygulanmıştır.

Yaptığımız çalışmada, karaciğerin histolojik yapısı incelenmiş, genel histolojik bulgular klasik literatür (11,25,28,35,68) bilgileriyle paralel olarak belirlenmiştir. Gruplarda herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

Deprem (23), fare karaciğerinde GPx 1 immunoreaktivitesinin hepatositlerde hem sitoplazmik hem de nükleer olarak görüldüğünü bildirmiştir. Ayrıca, immunoreaktivitenin özellikle vena sentralisler ile Kiernan aralığı çevresindeki hepatositlerde daha yoğun olduğunu ve endotel hücre ile bağ doku alanlarında immunoreaktivitenin olmadığını belirtmiştir. Asayama ve arkadaşlarının (9) immunogold tekniği ile rat hepatositlerinde sellüler glutatyon peroksidazın hücre içi dağılımını inceledikleri çalışmalarında, ışık mikroskopik incelemeler sonucunda lokalizasyonun çekirdek ve sitoplazmada olduğunu görmüşlerdir. İmmunoelektron mikroskopik yöntemle de GPx'in çekirdekte, peroksizomlarda, lizozomlarda, sitoplazmik matrixte ve en çok miktarda mitokondride bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuç, sellüler GPx'in rat hepatositlerinin içinde birçok kısımda bulunduğunu ortaya koymuştur. Yapılan başka bir çalışmada Asayama ve arkadaşları (10) da rat akciğerinde GPx'in immunohistokimyasal lokalizasyonunu incelemiş ve karaciğerle benzer şekilde hücrelerde çekirdekte ve sitoplazmada çeşitli kompartmanlarda GPx'in bulunduğunu ancak en fazla miktarda mitokondride bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Yoshimura ve arkadaşları (74) rat karaciğerinde glutatyon peroksidazın immunohistokimyasal lokalizasyonunu incelemek amacıyla indirek metotla yaptıkları immunohistokimyasal çalışmada, glutatyon peroksidazın özellikle hepatositlerin sitoplazmalarında lokalize olduğunu ve reaksiyonun portal alanlarda hepatik lobüllerin periferinde daha güçlü olduğunu görmüşlerdir. Ayrıca yine bu çalışmada GPx'in karaciğer paransim hücrelerinde yoğun olarak lokalize olduğu görülürken, sinüzoidler etrafındaki endotel hücreleri ile Kupffer hücrelerinde boyanma görülmemiştir.

Çalışmamızda, GPx 1 immunoreaktivitesinin bazı hepatositlerde sitoplazmik, daha az sayıdaki bazı hepatositlerde nükleer, yaygın olarak da hem sitoplazmik hem nükleer olduğu görüldü. Bu bulgular, Deprem (23), Asayama ve arkadaşları (9,10) ile Yoshimura ve arkadaşlarının (74) bulgularını destekler niteliktedir. Ayrıca, çift çekirdekli hepatositlerin bazılarında GPx 1 immunoreaktivitesinin çekirdeklerden birinde pozitif diğerinde ise negatif olduğu görüldü. Bu durumun çekirdeklerden birinin fonksiyonel diğerinin ise bu süreçte fonksiyonel olmamasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Fötal ve neonatal rat dokularında glutatyon peroksidazın immunohistokimyasal lokalizasyonunun incelendiği bir çalışmada (8) gebeliğin 15. gününden itibaren karaciğerde sentral venin etrafındaki alanda glutatyon peroksidaz immunohistokimyasal olarak belirlenmiştir.

Murakoshi ve arkadaşları (51) da karaciğerde yaptıkları immunohistokimyasal bir çalışmada glutatyon peroksidazın hepatik lobüllerin portal zonlarındaki hepatositlerde daha yoğun olduğunu görmüşlerdir. Bu durumu, bu alanlarda lipid peroksidasyonlarının çok olduğu ve glutatyon peroksidazın da lipid peroksidasyonlarının azaltılmasında etkili olduğu şeklinde yorumlamışlardır.

Bizim yaptığımız çalışmamızın sonuçları, Deprem (23), Yoshimura ve arkadaşları (74), Asayama ve arkadaşları (8) ile Murakoshi ve arkadaşlarının (51) bulgularıyla uyumlu olarak enzimin özellikle Kiernan aralığı ile vena sentralisler çevresindeki hepatositlerde çok daha yoğun olduğunu göstermiştir. Bu lokalizasyonun, burada metabolik aktivitenin yoğun olması, dolayısı ile serbest radikal oluşumunun fazla olması ve GPx 1'in burada bir bariyer görevi görmesi sebebiyle olduğunu düşünmekteyiz. Endotel hücreleri ile Kupffer hücrelerinde immunohistokimyasal reaksiyonun olmadığı görülmüştür. Ayrıca karaciğeri saran kapsülde de immunoreaktivite görülmemiştir.

Antioksidan enzimler, hücrede kendiliğinden ya da toksinler tarafından oluşturulan serbest radikallere karşı hücresel savunmanın önemli bir parçasını oluştururlar (46). Antioksidan enzimlerin regülasyonu ve aktivitesi

temelde hücrenin oksidan durumuna bağlıdır, ancak antioksidan enzim aktivitesini ve gen ekspresyonunu arttıran başka faktörler de rapor edilmiştir (63). Lankoff ve arkadaşları (41) melatoninin süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesini arttırdığını ve bu şekilde oksidatif strese karşı koruyucu olabileceğini belirtmişlerdir.

Melatoninin güçlü bir serbest radikal tutucu ve genel bir antioksidan madde olduğu bildirilmiştir (39). Son on yılda, bir antioksidan madde olan melatoninin bir takım genomik hareketlere sahip olduğu ve çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Ayrıca, melatoninin hem antioksidan enzim aktivitesini hem de bu enzimlerin hücresel mRNA seviyelerini etkilediği belirtilmektedir (63).

Anisimov'un (5) bildirdiğine göre, melatoninin antioksidan sistem üzerinde etkili olduğu ve farklı dokularda SOD, CAT, GPx gibi birçok antioksidan enzimi uyararak bunların hem aktivitelerini hem de gen ekspresyonlarını arttırıcı yönde etki ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur.

Mayo ve arkadaşları (46) yaptıkları çalışmalarda melatoninin fizyolojik serum konsantrasyonlarında ( $\approx 1\text{nM}$ ) nöronal hücre hatlarında hem süperoksit dismutaz (SOD) hem de glutatyon peroksidaz (GPx) için mRNA seviyelerini arttırdığını bildirmişlerdir

Kotler ve arkadaşlarının (39) erkek ratların beyin korteksinde antioksidan enzimlerin gen ekspresyonunda melatoninin etkisinin araştırılması amacıyla yaptıkları çalışmanın sonuçları hem akut hem de kronik şekilde ekzojen olarak uygulanan melatoninin bu dokuda GPx, ZnSOD ve MnSOD için mRNA düzeylerini arttırdığını açıkça ortaya koymuştur. Ayrıca, melatoninin antioksidan enzimler için gen ekspresyonunu stimüle ederek serbest radikal hasarlarına karşı indirekt koruma sağlayarak önemli bir rol oynadığını belirterek bunun sonucunda da melatoninin, aşırı serbest radikal üretiminin ortaya çıktığı bazı nörodejenaratif hastalıklarda potansiyel bir terapötik ajan gibi işlev gördüğünü düşünmüşlerdir.

Başka bir çalışmada (67) melatoninin glutatyon, glutatyon transferaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesini karaciğer ve böbrekte arttırdığı bildirilmiştir. Benzer şekilde Bharti ve arkadaşları (15) serebral epifizeal proteinlerin ve



melatoninin hepatik ve renal antioksidan mekanizmayı aktive ederek düzenlediğini ve karaciğerde GPx ve SOD aktivitesini arttırdığını bildirmişlerdir.

Mauriz ve arkadaşları (45), melatoninin genç ve yaşlı ratların karaciğerinde oksidatif strese, antioksidan enzimlerin gen ekspresyonuna ve aktivitesine etkisini belirlemek için yaptıkları çalışmalarında, 4 hafta süreyle içme suyuna katılan (20mg/L) melatoninin yaşlı ratların karaciğerinde oksidatif stresi ortadan kaldırdığını, katalaz ve CuZn-SOD ve GPx gen ekspresyonlarının düzenlenmesine katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir.

Gómez ve arkadaşları (27) rat hipokampüsünde alüminyumun prooksidan aktivitesi ve melatonin uygulamasının antioksidan enzimlerin gen ekspresyonuna etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, melatoninin SOD ve CAT mRNA düzeylerini arttırdığını, GPx aktivitesinde ise bir değişikliğin bulunmadığını belirtmişlerdir.

Bizim bulgularımız Gómez ve arkadaşlarından (27) farklı, Mayo ve arkadaşları (46), Kotler ve arkadaşları (39), Anisimov (5), Bharti ve arkadaşları (15), Swiderska-Kolacz ve arkadaşları (67) ile benzer olarak melatonin uygulanan deneme grubuna ait farelerin karaciğer dokusunda GPx 1 gen ekspresyonunun kontrol ve sham gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı ( $P < 0,05$ ) olarak arttığını ortaya çıkarmıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda melatoninin antioksidan enzimlerden biri olan GPx 1'in gen ekspresyonuna etkisi ve enzimin karaciğerde immunohistokimyasal lokalizasyonunu incelemek amacıyla swiss albino farelere 4 hafta süreyle 10 mg/kg (i.p.) melatonin uygulaması yapılmış ve deney süresi sonunda deneme, kontrol ve sham gruplarına ait karaciğer doku örnekleri alınarak incelenmiştir. Histolojik incelemelerde karaciğerin histolojik yapısının klasik bilgilerle (11,25,28,35,68) paralellik gösterdiği, herhangi bir farklılığın bulunmadığı belirlenmiştir. GPx 1'in immunohistokimyasal lokalizasyonu açısından deneme, kontrol ve sham grupları arasında bir fark olmadığı, tüm gruplarda reaksiyonun hem sitoplazmik hem de nükleer olduğu ve özellikle Kiernan aralığı ile vena sentralisler etrafındaki hepatositlerde daha belirgin olarak bulunduğu görülmüştür. Yapılan moleküler incelemeler

sonucunda da, deneme grubuna ait örneklerde glutatyon peroksidaz enziminin ekspresyon düzeyinin kontrol ve sham gruplarına göre istatistiksel düzeyde anlamlı bir artış gösterdiği görülmüştür. Kontrol ve sham grupları arasında ise istatistiksel düzeyde bir farkın bulunmadığı belirlenmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen bulgular, serbest radikallerin artmasına sebep olan durumlarda melatoninin koruyucu ve tedaviye destek olucu bir ajan olarak kullanılmasını destekler niteliktedir.

## 6. ÖZET

Bu çalışma, güçlü bir antioksidan madde olan melatoninin eksojen uygulamasının fare karaciğerinde antioksidan enzimlerden biri olan glutatyon peroksidaz'ın gen ekspresyonuna etkisinin ve enzimin immunohistokimyasal lokalizasyonunun incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan 24 adet erkek swiss albino fare, deneme (n=8), sham (n=8), kontrol (n=8) olmak üzere üç gruba ayrıldı. Deneme grubuna 4 hafta boyunca etanolde çözdürülüp serum fizyolojikle sulandırılmış 10 mg/kg dozda melatonin (i.p.) uygulandı. Sham grubuna da sadece ethanol ve serum fizyolojik solüsyonu uygulandı. Kontrol grubuna ise hiçbir uygulama yapılmadı. Deney süresi sonunda doku örneklerinde RT-PCR yöntemi ile GPx 1 enziminin gen ekspresyonu, enzimin karaciğer dokusunda immunohistokimyasal lokalizasyonu ve rutin histolojik boyamalarla (PAS, H.E., Triple boyama) da dokunun normal histolojik yapısı incelendi.

Yapılan incelemeler sonucunda deneme grubunda GPx 1 enziminin ekspresyon düzeyinin sham ve kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı ( $P<0,05$ ) bir artış gösterdiği görüldü. Yapılan immunohistokimyasal incelemelerde de, immunoreaktivitenin özellikle Kiernan aralığı ile vena sentralisler etrafındaki hepatositlerde yoğunlaştığı ve reaksiyonun hepatositlerde çoğunlukla hem sitoplazmik hem de nükleer olarak bulunduğu görüldü. Ayrıca, rutin histolojik incelemelerde gruplar arasında hiçbir farklılığa rastlanmadı.

**Anahtar sözcükler:** Melatonin, Karaciğer, GPx 1, RT-PCR, İmmunohistokimya.

## 7. SUMMARY

This study was carried out to determine effect of exogenous administration of melatonin, which is a potent antioxidant substance, on gene expression of antioxidant enzyme glutathione peroxidase in mice and to detect localization of this enzyme with immunohistochemistry in liver.

Twenty-four male swiss albino mice were divided into three groups as follows: sham (n=8), control (n=8) and treatment (n=8). Melatonin (10 mg/kg) dissolved in ethanol and diluted with isotonic NaCl solution was administered for 4 weeks to treatment group through intra peritoneal injection. Ethanol and isotonic NaCl solution was administered to sham group. No application was made to the control group. At the end of experimental period, gene expression of GPx 1 enzyme with RT-PCR method, immunohistochemical localization of the enzyme, and normal histological structure of tissues by routine histological staining methods (H.E., PAS, Triple staining) were examined in liver tissue samples.

In conclusion, the level of GPx 1 enzyme expression was shown significantly ( $P < 0,05$ ) higher in treatment group compared to sham and control groups. Immunohistochemical investigations reveal increase in immunoreactivity especially in hepatocytes surrounding Kiernan area and vena centralis. Immunoreactivity was seen both nucleus and cytoplasm in hepatocytes. Moreover, there was no difference between groups in routine histological investigations.

**Key words:** Melatonin, Liver, GPx 1, RT-PCR, Immunohistochemistry.

## 8. KAYNAKLAR

1. **Acuna-Castroviejo, D., Escames, G., Rodriguez, M.I., Lopez, L.C.:** Melatonin role in the mitochondrial function. *Front. Biosci.* 12: 947-63, 2007.
2. **Akkuş, İ. :** Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları. Konya. 1995.
3. **Akpoyraz, M., Durak, İ.:** Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Tıp Mecmuası.* 48: 253-262,1995.
4. **Aksoy, Y.:** Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *T. Klin. J. Med. Sci.* 22: 442-448, 2002.
5. **Anisimov, V.N.:** Effects of exogenous melatonin—A review. *Toxicol. Pathol.* 31: 589-603, 2003.
6. **Arendt, J.:** Melatonin. *Clin. Endocrinol.* 29: 205-229, 1988.
7. **Armağan, A., Uz, E., Yılmaz, H.R., Soyupek, S., Oksay, T., Özçelik, N.:** Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Asian J. Androl.* 8 (5): 595–600, 2006.
8. **Asayama, K., Dobashi, K., Kawada, Y., Nakane, T., Kawaoi, A., Nakazawa, S.:** Immunohistochemical localization and quantitative analysis of cellular glutathione peroxidase in foetal and neonatal rat tissues: fluorescence microscopy image analysis. *Histochem. J.* 28(1): 63-71, 1996.
9. **Asayama, K., Yokota, S., Dobashi, K., Hayashibe, H., Kawaoi, A., Nakazawa, S.:** Purification and immunoelectron microscopic localization of cellular glutathione peroxidase in rat hepatocytes: quantitative analysis by postembedding method. *Histochemistry.* 102(3): 213-9, 1994.
10. **Asayama, K., Yokota, S., Dobashi, K., Kawada, Y., Nakane, T., Kawaoi, A., Nakazawa, S.:** Immunolocalization of cellular glutathione peroxidase in adult rat lungs and quantitative analysis after postembedding immunogold labeling. *Histochem. Cell Biol.* 105(5): 383-9, 1996.

11. **Banks, W.J.:** Applied Veterinary Histology. Third Edition. Mosby-Year Book, Inc. Missouri, 1993.
12. **Baydas G, Gursu MF, Yilmaz S, Canpolat S, Yasar A, Cikim G, Canatan H.:** Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neurosci Lett.* 3;323(3):195-8, 2002.
13. **Bettahi, I., Pozo, D., Osuna, C., Reiter, R.J., Acuña-Castroviejo, D., Guerrero, J.M.:** Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J. Pineal Res.* 20: 205-210, 1996.
14. **Beyer, C.E., Steketee, J.D., Saphier, D.:** Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery. *Biochem. Pharmacol.* 56: 1265-1272, 1998.
15. **Bharti, V.K., Srivastava, R.S., Subramanian, P., Warren Spence, D., Pandi-Perumal, S.R., Brown, G.M.:** Cerebral epiphyseal proteins and melatonin modulate the hepatic and renal antioxidant defense of rats. *Int. J. Nephrol.* doi:10.4061/2011/142896, 2011.
16. **Brigelius-Flohé, R.:** Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol. Med.* 27: 951-965, 1999.
17. **Brzezinski, A.:** Melatonin in humans. *N. Engl. J. Med.* 336: 186-195, 1997.
18. **Chomczynski, P., Sacchi, N.:** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-9, 1987.
19. **Çam, A., Erdoğan, M.F.:** Melatonin. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası.* 56(2): 103-112, 2003.
20. **Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T.:** Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Derg.* 3-4: 92-95, 1997.
21. **Çolakoğlu, N., Ozan, E., Sönmez, M.F., Yılmaz, S., Ozan, G.:** Sigaranın karaciğerde oluşturduğu yapısal değişiklikler üzerine melatonin ve C vitamininin etkileri. *Fırat Tıp Derg.* 10(3): 108-112, 2005.
22. **Demir, F., Narin, F., Akgün, H., Üzüm, K., Saraymen, R., Baykan, A., Köklü, E.:** Doksorubisin ile oluşturulmuş deneysel kardiyotoksosite üzerine melatoninin etkisi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Derg.* 47: 260-268, 2004.

- 23. Deprem, T.:** Sağlıklı ve diabet oluşturulmuş farelerin karaciğer dokusunda glutatyon peroksidaz enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonu ve RT PCR ile gen ekspresyonu. Doktora Tezi. Kars, 2009.
- 24. Erden, M., Bor, N.M.:** Changes of reduced glutathion, glutathion reductase, and glutathione peroxidase after radiation in guinea pigs. *Biochem. Med.* 31(2):217-27, 1984.
- 25. Eurell, J. A., Frappier, B. L. (Eds.) :** Dellmann's Textbook of Veterinary Histology. Sixth Edition. Blackwell Publishing USA, 2006.
- 26. Ferret, P.J., Soum, E., Negre, O., Fradelizi, D.:** Auto-protective redox buffering systems in stimulated macrophages. *BMC Immunol.* 12: 3:3, 2002.
- 27. Gómez, M., Esparza, J.L., Nogués, M.R., Giralt, M., Cabré, M., Domingo, J.L.:** Pro-oxidant activity of aluminum in the rat hippocampus: gene expression of antioxidant enzymes after melatonin administration. *Free Radic. Biol. Med.* 38(1): 104-11, 2005.
- 28. Gülmez , N.:** Sindirim Sistemi III. 185-196. Özer, A. (Editör). Veteriner Özel Histoloji. I. Baskı. Nobel Yayın. Ankara. 2008.
- 29. Hardeland, R., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D-X.:** The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17: 347-357, 1993.
- 30. Harris, E.D.:** Regulation of antioxidant enzymes. *The FASEB Journal.* 6: 2675-2683, 1992.
- 31. Hassa, O., Aşti, R.N.:** Embriyoloji. Yorum Matbaacılık. 3. Baskı. Ankara, 1997.
- 32. Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H.:** Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal Histochemistry & Cytochemistry.* 29: 577-580, 1981.
- 33. Ianăş, O., Olinescu, R., Bădescu, I.:** Melatonin involvement in oxidative processes. *Endocrinologie.* 29(3-4): 147-53, 1991.

- 34. Imai, H., Nakagawa, Y.:** Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 34(2): 145-169, 2003.
- 35. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O.:** Temel Histoloji. Çev. Ed.: Aytakin, Y. 7. Baskı. Barış Kitabevi. İstanbul, 1992.
- 36. Kabukçu, M. A.:** Sağlık Sosyal ve Fen Bilimlerinde Uygulamalı İstatistik. Selçuk Üniv. Ziraat Fak. Tarım Ekonomi Bölümü. Konya, 1994.
- 37. Kılınç, K., Kılınç, A.:** Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Derg.* 33(2): 110-118, 2002.
- 38. Kocamış, H.:** Functional profiles of growth related genes during embryogenesis and postnatal development of chicken and mouse skeletal muscle. Doktora Tezi. Morgantown, West Virginia, 2001.
- 39. Kotler, M., Rodriguez, C., Sainz, R.M., Antolin, I., Menendez-Pelaez, A.:** Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J. Pineal Res.* 24: 83-89, 1998.
- 40. Kuş, İ., Zararsız, İ., Ögetürk, M., Yılmaz, H.R.:** Formaldehit nörotoksitesine bağlı hipokampusta gelişen oksidatif hasar ve melatonin hormonunun koruyucu etkisi: deneysel bir çalışma. *Fırat Tıp Derg.* 12(4): 256-260, 2007.
- 41. Lankoff, A., Banasik, A., Nowak, M.:** Protective effect of melatonin against nodularin-induced oxidative stress. *Arch. Toxicol.* 76(3): 158-65, 2002.
- 42. Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H., Mori, W.:** Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 2587, 1958.
- 43. Longoni, B., Salgo, M.G., Pryor, W.A., Marchiafava, P.L.:** Effects of melatonin on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. *Life Sci.* 62: 853-859, 1998.
- 44. Luna, L.G.:** Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Ed. Mc Graw-Hill Book Comp. 1968.



- 45. Mauriz, J.L., Molpeceres, V., García-Mediavilla, M.V., González, P., Barrio, J.P., González-Gallego, J.:** Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J. Pineal Res.* 42(3):222-30, 2007.
- 46. Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antoli, I., Herrera, F., Martin, V., Rodriguez, C.:** Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* 59(10): 1706-13, 2002.
- 47. Menvielle-Bourg, F.J.:** Superoxide Dismutase (SOD), a powerful antioxidant, is now available orally. *Phytotherapie.* 3: 1-4, 2005.
- 48. Mills, G.C.:** Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229: 189–197, 1957.
- 49. Minitab for Windows, Release 10.** Minitab Inc. USA, 1994.
- 50. Moyes, C.D., Schulte, P.M.:** Principles of Animal Physiology. Pearson Education, Inc. San Francisco, 2006.
- 51. Murakoshi, M., Fukui, N., Takekoshi, S.:** Immunohistochemical and biochemical studies in 4-aminopyrazolopyrimidine (4-APP)-induced fatty liver. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 27(3): 73-7, 2002.
- 52. Nakane, T., Asayama, K., Kodera, K., Hayashibe, H., Uchida, N., Nakazawa, S.:** Effect of selenium deficiency on cellular and extracellular glutathione peroxidases: immunochemical detection and mRNA analysis in rat kidney and serum. *Free Radic. Biol. Med.* 25: 504-511, 1998.
- 53. O'Connell, J.:** Methods in Molecular Biology. RT-PCR Protocols. Ireland: Humana Pres. 2002.
- 54. Özgüner, F., Özcankaya, R., Delibaş, N., Koyu, A., Çalışkan, S.:** Melatonin ve Klinik Önemi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi.* 2(4):1-6, 1995.
- 55. Palaoğlu, S., Beşkonaklı, E.:** Pineal bez ve yaşlanma. *Turkish J. Geriatrics.* 1(1):13-18, 1998.
- 56. Reiter, R.J.:** Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 26: 1141-1155, 1993.

- 57. Reiter, R.J.:** Functional diversity of the pineal hormone melatonin: its role as an antioxidant. *Exp. Clin. endocrinol.* 104: 10-16, 1996.
- 58. Reiter, R.J.:** Melatonin: clinical relevance. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 17:273-285, 2003.
- 59. Reiter, R.J., Poeggeler, B., Tan, D.:** Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol. Lett.* 15: 103-116, 1993.
- 60. Reiter, R.J., Carneiro, R.C., Oh, C.S.:** Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res.* 29(8):363-72, 1997.
- 61. Reiter, R.J., Tan, D.X., Osuna, C., Gitto, E.:** Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J. Biomed. Sci.* 7(6): 444-58, 2000.
- 62. Reiter, R.J., Tan, D.X., Terron, M.P., Flores, L.J., Czarnocki, Z.:** Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. Review. *Acta Biochim Pol.* 54(1):1-9, 2007.
- 63. Rodriguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., Reiter, R.J.:** Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* 36(1): 1-9, 2004.
- 64. Schaffazick, S.R., Siqueira, I.R., Badejo, A.S., Jornada, D.S., Pohlmann, A.R., Netto, C.A., Guterres, S.S.:** Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69(1): 64-71, 2008.
- 65. Simmons, T.W., Jamall, I.S.:** Significance of alterations in hepatic antioxidant enzymes: Primacy of glutathione peroxidase. *Biochem. J.* 251: 913-917, 1988.
- 66. Sugden, D.:** Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia.* 45: 922-932, 1989.
- 67. Swiderska-Kolacz, G., Klusek, J., Kolataj, A.:** The effect of melatonin on glutathione and glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the mouse liver and kidney in vivo. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 27(3): 365-8, 2006.
- 68. Tanyolaç, A.:** Özel Histoloji. Yorum Basın Yayın San. Ankara, 1999.

- 69. Tekin, M. E.:** Sağlık Bilimleri İçin Örneklerle Bilgisayarda Biyoistatistik. Selçuk Üniv. Zootekni Anabilim Dalı. Konya, 2003.
- 70. Topal, T., Öter, Ş., Korkmaz, A.:** Melatonin ve kanserle ilişkisi. Genel Tıp Derg. 19(3):137-143, 2009.
- 71. Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R.J., Weinberg, K., Rea, T.H., Bloom, B.R., Modlin, R.L.:** Defining protective responses to pathogens: Cytokine profiles in leprosy lesions. Science. 254: 277-279, 1991.
- 72. Yazıcı, C., Köse, K.:** Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü. Erciyes Üniv. Sağ. Bil. Derg. 13(2): 56-65, 2004.
- 73. Yılmaz, B.:** Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi. Feryal Matbaacılık. Ankara, 1999.
- 74. Yoshimura, S., Komatsu, N., Watanabe, K.:** Purification and immunohistochemical localization of rat liver glutathione peroxidase. Biochim. Biophys. Acta. 621(1): 130-7, 1980.
- 75. Zık, B.:** Sindirim Sistemi. 243-259. Özer, A. (Editör). Veteriner Embriyoloji. 3. Baskı. Nobel Yayın. Ankara. 2007.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

İstanbul 'un Üsküdar ilçesinde 24.07.1983 tarihinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi İstanbul'da tamamladım. 2001 yılında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi 'nde lisans öğrenimime başladım ve 2006 yılında bu fakülteden mezun oldum. 2006 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı 'nda Doktora öğrenimime başladım. 2008 yılında Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı 'na Araştırma Görevlisi olarak atandım halen aynı görevime devam etmekteyim. Evliyim.