T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA MELATONİN DESTEĞİNİN AKUT (HAFİF VE AĞIR) EGZERSİZLE ÇEŞİTLİ DOKULARDA OLUŞAN LİPİD PEROKSİDASYONU VE ANTİOKSİDAN DURUM ÜZERİNE ETKİLERİ

Sevde HARMANDARO EREN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hüseyin UYSAL

KONYA – 2008

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA MELATONİN DESTEĞİNİN AKUT (HAFİF VE AĞIR) EGZERSİZLE ÇEŞİTLİ DOKULARDA OLUŞAN LİPİD PEROKSİDASYONU VE ANTİOKSİDAN DURUM ÜZERİNE ETKİLERİ

Sevde HARMANDARO EREN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Hüseyin UYSAL

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 07202029 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA – 2008

ÖNSÖZ

Akut egzersiz oksijen tüketiminin artmasıyla plazma ve dokularda serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunda artışa yol açar. Bu durumun oksidatif hasara neden olduğu bilinmekte, günümüzde antioksidanların oksidatif stres üzerine etkileri yaygın olarak araştırılmaktadır.

Hem in vivo hem in vitro deneylerde MEL'in, güçlü bir antioksidan olduğu belirtilmiştir. Melatonin uygulamasının dokularda antioksidan enzim kapasitesini uyararak serbest radikal oluşumunu önlediği bildirilmektedir. Bu çalışmada akut (hafif ve ağır) koşu egzersizi yaptırılan sıçanlarda melatonin uygulamasının plazma ve dokularda lipit peroksidasyonu ve antioksidan durum üzerine etkileri araştırılmıştır.

Yüksek lisans öğrenciliğim ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini aktararak desteklerini esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam sayın Prof. Dr. Hüseyin UYSAL'a;

Selçuk Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (SÜDAM) Müdürü Prof. Dr. Hakkı GÖKBEL'e;

Deneysel çalışmada emeği geçen sayın Doç. Dr. Nilsel OKUDAN'a ve Dr. Çiğdem DÖLEK'e, biyokimya analizlerinin gerçekleşmesini sağlayan sayın Prof. Dr. Sadık BÜYÜKBAŞ'a, istatistik analizleri yapan Prof. Dr. Said BODUR'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ i

ŞEKİL ve GRAFİK LİSTESİ ii

SİMGELER VE KISALTMALAR iii

1. GİRİŞ 1

1.1. Pineal Bez 3

1.2. Melatonin 3

1.2.1. Melatonin Sentezi ve Salınımı 3

1.2.2. Melatonin Sekresyonunun Düzenlenmesi 4

1.3. Egzersizin Endojen Melatonin Sekresyonu Üzerine Etkileri 5

1.3.1. Melatonin ve Gece Egzersizi 6

1.3.2. Endojen Melatoninin Dayanıklılık Egzersizi Üzerine Etkisi 7

1.4. Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres 8

1.4.1. ROS ve RNS'nin Etkilerine Karşı Hücredeki Koruma Sistemi 10

1.5. Egzersiz, Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem 11

1.5.1. Akut Egzersizde Oksidatif Stres 11

1.5.2. Akut Egzersizde Lipit Peroksidasyon ve Antioksidan Sistem 12

1.5.3.Düzenli Egzersizde Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma 12

1.6. Melatoninin Takviyesinin Serbest Radikal Giderici Etkisi 13

2. GEREÇ ve YÖNTEM 16

2.1. Gereç 16

2.1.1. Hayvan Sağlanması 16

2.1.2. Test Öncesi Şartlar 16

2.1.3. Grupların Oluşturulması, Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması 16

2.1.4. Kan ve Doku Örneklerinin İncelenmesi 17

2.2. Yöntem 20

2.2.1. Kullanılan Analiz Yöntemleri 20

2.3. İstatistiksel Analizler 22

3. BULGULAR 23

3.1. Melatonin Kullanımıyla Beyin ROS Aktivasyonunda (MDA, NO, XO) ve Antioksidan Enzimlerde (SOD) Meydana Gelen Değişiklikler 23

3.2. Melatonin Kullanımıyla Karaciğer ROS Aktivasyonunda (MDA, NO, XO) ve Antioksidan Enzimlerde (SOD) Meydana Gelen Değişiklikler 25

3.3. Melatonin Kullanımıyla Böbrek ROS Aktivasyonunda (MDA, NO, XO) ve Antioksidan Enzimlerde (SOD) Meydana Gelen Değişiklikler 25

3.4. Melatonin Kullanımıyla Plazma ROS Aktivasyonunda (MDA, NO, XO) ve Antioksidan Enzimlerde (SOD) Meydana Gelen Değişiklikler 26

4. TARTIŞMA 28

5. SONUÇ ve ÖNERİLER 32

6. ÖZET 33

7. SUMMARY 34

8. KAYNAKLAR 35

9. ÖZGEÇMİŞ 39

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Grupların beyin nitrik oksit, malondialdehit, ksantin oksidaz, süperoksit dismutaz değerleri……..…….23

Tablo 2: Grupların karaciğer nitrik oksit, malondialdehit, ksantin oksidaz, süperoksit dismutaz değerleri ……..……25

Tablo 3: Grupların böbrek nitrik oksit, malondialdehit, ksantin oksidaz, süperoksit dismutaz değerleri ……..26

Tablo 4: Grupların plazma nitrik oksit, malondialdehit, ksantin oksidaz, süperoksit dismutaz değerleri……...27

ŞEKİL ve GRAFİK LİSTESİ

Şekil 1: Melatonin sentezi 4

Grafik 1: Tüm gruplara ait beyin dokusu MDA ortalamaları (nmol/g protein) 24

Grafik 2: Tüm gruplara ait beyin dokusu SOD ortalamaları (U/mg protein) 24

SİMGELER VE KISALTMALAR

APUD: Amine Precursor Uptake and Decarboxylation

CAT: Katalaz

EC: Enterokromaffin

GPX: Glutatyon peroksidaz

GR: Glutatyon redüktaz

GSH: Glutatyon

GST: Glutatyon-S-transferaz

G6PD: Glukoz 6-fosfat dehidrojenaz

HO^- : Hidroksil radikali

H_2O_2. Hidrojen peroksit radikali

HOCl: Hipoklorik asit

MDA: Malondialdehit

MEL: Melatonin

NAT: N-asetil transferaz

NBT: Nitro blue tetrazoliumu

NK: Natural killer

NO: Nitrik oksit

NO_2^-: Nitrit

NO_3^-: Nitrat

NOS: Nitrik oksit sentaz

O_2: Singlet oksijen radikali

O_2^-: Süperoksit anyon radikali

$ONOO^-$: Peroksinitrit radikali

RNS: Reaktif nitrojen türleri

ROS: Reaktif oksijen türleri

SCN: Suprakiyazmatik nükleus

SOD: Süperoksit dismutaz

TBA: Tiobarbitürik asit

XO: Ksantin oksidaz

1. GİRİŞ

Melatoninin birçok tür içinden özellikle insanların vücut dokuları üzerinde etkileri olduğunu göstermek amacıyla son 20 yılda araştırma delilleri artmıştır (Atkinson ve ark 2003).

Reaktif oksijen türleri, lipidler, proteinler ve DNA üzerine pro-inflamatuar etkilerinin yanında organizma üzerinde zararlı etkilere de sahiptir (Bloomer ve ark 2004). Akut egzersizin reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve nitrojen türlerinin oluşumuna ve bununla bağlantılı oksidatif hasara neden olduğu (Radak ve ark 1998), düzenli antrenmanın ise süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırmak suretiyle oksidatif stresin zararlı etkilerini ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (Greathouse ve ark 2005).

Hücreler kendilerini serbest radikallerin zararlı etkilerinden enzimler, vitaminler ve glutatyon ile ürik asit gibi çeşitli diğer moleküllerle belli bir dereceye kadar koruyabilirler. Hem in vitro, hem de in vivo çalışmalarda, melatoninin güçlü bir serbest radikal temizleyici ajan olduğu gösterilmiştir (Reiter ve ark 1997). Serbest radikal yakalayıcı etkisi bakımından, bilinen tüm antioksidanlardan (mannitol, glutatyon ve E vitamini gibi) daha güçlüdür (Tan ve ark 1993). Antioksidan olarak MEL, nüklear DNA'yla birlikte membran lipidlerini ve muhtemel sitosolik proteinleri oksidatif hasara karşı korumada etkilidir (Reiter ve ark 1997).

Fiziksel aktivitenin plazma melatonin düzeylerinde değişikliğe yol açabileceği bildirilmektedir (Buxton ve ark 1997a). Ayrıca, ekzojen melatonin verilmesiyle egzersiz süresince karbonhidrat kullanımının azaldığı ve lipit kullanımının arttığı ortaya çıkmıştır (Mazepa ve ark 2000). Glikojenin olumlu etkisinin, potansiyel dayanıklılık kapasitesini arttırabildiği bilinmektedir (Mazepa ve ark 2000).

Egzersizin plazma ve dokularda serbest radikal oluşumunu artırdığı, melatonin uygulamasının ise dokularda antioksidan enzim kapasitesini uyararak serbest radikal oluşumunu önlediği bildirilmektedir (Hara ve ark 1996). Sonuç olarak birçok araştırıcı melatonin ve egzersiz arasında kaçınılmaz bir ilişkiye dikkat çekmektedir.

Melatoninin oksidatif stres ve antioksidan savunma üzerine etkilerini araştıran bu ve benzeri çalışmalar bulunmasına rağmen, hafif ve ağır egzersizde oluşan oksidatif stres ve antioksidan savunma üzerine melatoninin etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu çalışmanın amacı akut hafif ve ağır koşu egzersizi yaptırılan sıçanlarda melatonin uygulamasının plazma ve dokularda lipit peroksidasyonu ve antioksidan durum üzerine etkilerini araştırmaktır.

1.1. Pineal Bez

Epifiz bezi olarak da bilinen pineal bez beyinde bulunan önemli bir nöroendokrin organdır. Dış çevrenin ışık veya karanlık olmasına göre organizmada başta endokrin sistem olmak üzere birçok sistemin fonksiyonunu düzenler ve hipotalamusta bulunan suprakiyazmatik nükleus (SCN) ile birlikte bir biyolojik saat gibi fonksiyon yapar. Pineal bez sirkadiyan bir ritimde ve karanlıkta salgıladığı MEL hormonu vasıtasıyla vücudun diğer kısımlarına zaman sinyalleri gönderir. Böylece, günün ve yılın farklı zamanlarına bağlı fizyolojik siklusların düzenlenmesinde görev alır (Keleştimur 1996).

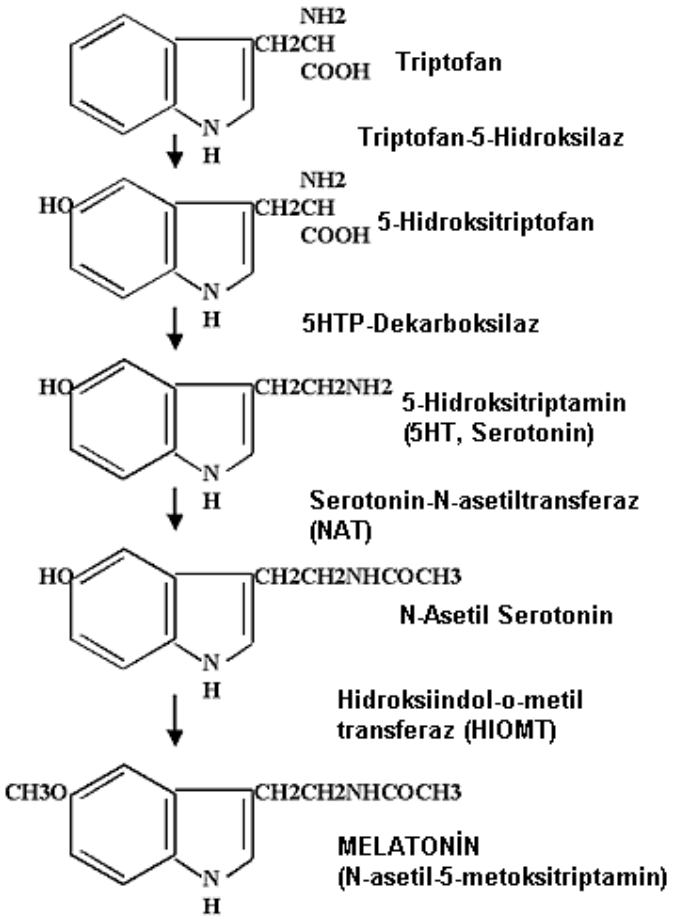
1.2. Melatonin

İlk kez 1958 yılında Aaron Lerner ve ark, pineal bezden salgılanan ve kurbağalardaki "melanofor hücreleri" ni etkilediği için "melatonin" adı verilen bu hormonun varlığına dikkati çekmiştir (Turgut ve ark 2002). Bugün MEL'in sirkadiyan ritimler, uyku, ruhsal durum, mevsimsel üreme fizyolojisi ve üreme davranışlarında ve retinal fizyolojide güçlü bir biyolojik modülatör olduğu bilinmektedir. Üstelik yaşlanma ve yaşla ilgili süreçlerde ve hastalık durumlarındaki etkisini gösteren deneysel çalışmalar onun güçlü bir antioksidan olduğunu ileri sürmektedir (Beyer ve ark 1998).

1.2.1. MEL Sentezi ve Salınımı

MEL sentezinin sadece pineal bezde olmadığı söylenebilir. Pineal bezin çıkarılması ile dolaşımdaki MEL düzeyleri azalmakta ancak tamamen yok olmamaktadır (Manev ve ark 1996). Diffuz nöroendokrin sisteminin bir kısmı olan APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) hücrelerinde, gastrointestinal kanaldaki enterokromaffin (EC) hücrelerinde küçümsenmeyecek düzeyde MEL sentezi olmaktadır (Bubenik ve Pang 1994). Ayrıca solunum yolları, karaciğer, böbrek, adrenal bezler, timus, tiroit, plasenta, mast hücreleri gibi nöroendokrin karakterde olmayan hücrelerde ve natural killer (NK) hücreler ile eozinofilik lökositlerde de tespit edilmiştir (Kvetnoy ve ark 1997). Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda SCN'un da MEL sentezleme yeteneğine sahip olduğu ama pineal bezdeki gibi önemli bir sirkadiyan ritme sahip olmadığı gösterilmiştir (Hamada 1999).

MEL sentezinin başlangıç maddesi, pineal bez tarafından plazmadan alınan ve bir indol aminoasidi olan triptofan'dır. Triptofan, pinealositlerde, triptofan-5-hidroksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptofan'a hidroksillenir. 5-hidroksiriptofan, aromatik-L-aminoasit dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) ile 5-hidroksitriptamin (serotonin)'e dekarboksillenir. Serotonin, N-asetil transferaz (NAT) enzimi ile N-asetil serotonin'e ve bu da, hidroksiindol-0-metil transferaz (HIOMT) etkisi ile MEL (N-asetil-5-metoksitriptamin)'e dönüşür (Brzezinski 1997).



Şekil 1: Melatonin sentezi.

1.2.2. Melatonin Sekresyonunun Düzenlenmesi

Işık, melatonin salınımında güçlü bir inhibitördür ve hormonun gündüz konsantrasyonları sıfıra yakındır. Serotoninden MEL'in sentezi ile ilişkili bir enzim olan N-asetiltransferaz, gece aktivitesi gündüz seviyelerine göre 1000 kat kadar fazla

olan belirgin bir ritmik fluktuasyon (iniş çıkış) gösterir (Atkinson ve ark 2003). İnsanlarda karanlık başladığında MEL seviyesi yükselmeye başlar. Gece yarısından sonra (02.00-04.00) pik seviyesine ulaşır ve sonra giderek düşer (Brzezinski ve ark 1997).

Serum MEL konsantrasyonu, yaşa göre de anlamlı olarak değişir. Yeni doğanlarda serum melatonin konsantrasyonu çok düşük seviyelerde seyreder (Beyer ve ark 1998). Humbert ve Pevet (1994) 60 yaşın üzerindeki insanların gündüz ve gece çok düşük MEL seviyelerine sahip olduğunu göstererek, fizyolojik MEL konsantrasyonu ve yaşlanma arasındaki ilişkiye dikkat çekmişlerdir.

1.3. Egzersizin Endojen Melatonin Sekresyonu Üzerine Etkileri

Egzersiz akut olarak MEL seviyelerini değiştirmekte ve yine 12–24 saat sonra gece salgılanan MEL seviyelerinin de değişmesine neden olmaktadır (Van Cauter ve ark 1993).

Hem akut hem de gecikmiş etkiler, egzersizin zamanlamasına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Tespit edilebilir akut etkinin varlığı da egzersizin yoğunluğuna, süresine ve tipine bağlıdır. MEL sekresyonunun gece yükselme fazı esnasında yapılan egzersiz, MEL seviyelerini baskılamaktadır. Düşük aktivite seviyeleri %40–60 maksimum oksijen tüketimi (VO_2 max), 3 saat süreyle MEL seviyelerini etkilememiş ama daha yoğun egzersiz % 75 (VO_2 max) 1 saat süreyle MEL seviyelerinde akut bir artışa neden olmuştur. Şiddeti ve yoğunluğu ne olursa olsun gün içindeki egzersizin MEL sekresyonu üzerinde tutarlı akut bir etkiye sahip olmadığı, ancak şiddetli veya orta dereceli olan gece egzersizinin bir sonraki akşam MEL başlangıç fazının gecikmesine neden olduğu ifade edilmektedir (Buxton 1997b).

Carr ve ark (1981) 13.00–18.00 saatleri arasında yapılan 60 dk.lık egzersizin MEL sekresyonu üzerine etkilerini ölçmüştür. 7 gönüllü kadının kan plazmasında, devamlı dayanıklılık antrenman programını içeren bir dizi akut submaksimal egzersizden önce ve sonra testler uygulayarak MEL düzeylerini ölçtüklerinde plazma MEL'in, tüm egzersiz evreleri sırasında dinlenme seviyelerine oranla (%100–200) belirgin bir şekilde arttığını ve her bir egzersiz sezonu tamamlandıktan 30 dk. sonra yeniden ölçüldüğünde esas değerlere doğru azaldığını belirtmişlerdir. Bu bulgular,

güçlü fiziksel aktivitenin, gerek egzersiz yapan gerekse yapmayan kadınlarda, plazma MEL düzeyinde geçici bir şekilde artışa neden olduğunu göstermektedir.

Carr ve ark (1981)'ın çalışmasına benzer sonuçlar erkek deneklerle çalışan Theron ve ark (1984) tarafından da bulunmuştur. Yetişkin siyah erkeklerde 09.00–13.00 saatleri arasında yapılan fiziksel egzersizden önce, hemen sonra ve 1 saat sonra plazma MEL seviyeleri incelenmiş bütün deneklerde MEL seviyelerinin egzersizden sonra artışa sebep olduğu, 1 saat sonra ise egzersiz öncesindeki seviyeye döndüğü belirtilmiştir. Çevresel ışıklandırması düşük (54 lux) bir odada egzersiz yapan deneklerde, ışıklandırması 320 lux olan odada egzersiz yapanlara oranla egzersiz sonrası plazma MEL seviyeleri yüksek bulunmuştur (Theron ve ark 1984).

İnsanlarda MEL konsantrasyonunun artışı, azalışı veya kısa süre süren egzersizlerde etkisiz kalmasının nedenleri belirsizdir. Egzersizin yoğunluğu kadar egzersizin yapıldığı zaman, katılımcıların yaşı, uygunlukları ve ışık durumlarındaki farklılıklar da etkilidir. Uzun süren egzersizler süresince, MEL sekresyonunun kronik olarak baskılanıp baskılanmadığı veya artıp artmadığı hakkında fikir ayrılıklarının oluş sebebini, olaya etki eden benzer faktörler açıklayabilir (Atkinson ve ark 2003).

1.3.1.Melatonin ve Gece Egzersizi

İnsanlarda fiziksel egzersizin geç saatteki MEL sekresyonu üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmada, 7 erkeğin gerek dinlenirken gerekse gece yapılan fiziksel egzersiz öncesi ve sonrasında plazma MEL seviyeleri ölçülmüş, MEL konsantrasyonları egzersiz sonrası kontrol seviyelerinden 3 saat boyunca belirgin ölçüde daha düşük bulunmuştur. Egzersizler sonucu açıkça göstermiştir ki, gece yapılan fiziksel egzersiz plazma MEL seviyelerindeki artışı engellemektedir. Literatürdeki bilgilerle birlikte bu bulgular, provokatif uyaranlara karşı pineal bezin tepkisinin uyarı tatbik edildiği esnadaki aktivite düzeyine bağlı olduğunu ortaya koymuştur (Monteleone ve ark 1990).

Buxton ve ark (1997a) gece yapılan fiziksel aktivite süresi ve yoğunluğunun insan sirkadiyan ritimleri üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla 8 sağlıklı deneğe 3 saat orta dereceli egzersiz, 1 saat de yüksek şiddetli egzersiz yaptırmışlar ve sonuç olarak gece yapılan fiziksel aktivitenin insan sirkadiyan ritimlerinde bozulmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Sıçanlarda, gece egzersizinin MEL üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hayvanlar iki gruba ayrılmış, birinci grup 00:30'da karanlıkta yüzdürülmüş ikinci grup ise aynı saatte ancak 15 ve 30 dakika ışığa maruz bırakılmıştır. Yüzme egzersizinde pineal bezdeki MEL içeriğinin hızla azaldığı, bununla birlikte MEL sentezinde önemli bir enzim olan N-asetiltransfraz (NAT) aktivitelerinin değişmediği belirtilmiştir. Zıt olarak ışığa maruz bırakılan sıçanlarda ise hem pineal bezdeki hem de plazmadaki MEL seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir (Yaga ve ark 1993).

Miyazaki ve ark (2001), özel izole edilmiş bir odada çeşitli zamanlarda tekrar tekrar egzersiz yapan bireylerde, herhangi bir egzersiz dönemi süresince ve egzersizden 3 saat sonra plazma melatonin seviyelerinin etkilenmediğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar Elias ve ark (1993) tarafından daha önce rapor edilen çalışmalarla uyumludur.

Elias ve ark (1993), gönüllü 7 erkek denek üzerinde yaptıkları bir çalışmada, egzersizden önce, egzersizden sonraki 30 saniye içinde, egzersizden sonraki 15 ve 30 dakika içinde olmak üzere aldıkları kan örneklerinde egzersiz sonrası melatonin sentezinde önemli bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir.

Literatürde egzersiz ve MEL konsantrasyonları ile ilişkili muhtemel 3 bulgu; "bir artış, bir azalış ve sabit kalma" şeklinde rapor edilmiştir. Bu çelişkili sonuçların egzersiz zamanının gün içindeki ve ışıklandırma şartlarındaki farklılıklarına bağlı olmasına karşın, cinsiyet ve yaş gibi ayrı ayrı olarak yapılan fiziksel aktivite seviyelerinin, etkileyici faktörler olması muhtemeldir (Atkinson 2003).

1.3.2. Endojen Melatoninin Dayanıklılık Egzersizi Üzerine Etkisi

Uzun süreli egzersiz boyunca hem glikoz, hem de yağ asitleri yakıt olarak kullanılır (Hagerman 1992). Dayanıklılık aktivitelerini yapmak için gerekli olan karbonhidratın çoğunun kas glikojeninin azalması ile sağlanmasına rağmen, uzun süren egzersiz süresince bir enerji maddesi olarak glikojenolizis ve glikoneojenezisden elde edilen karaciğer glikojeninin katkısı daha fazladır. Kas glikojenini stoklama ve devam ettirme yeteneğinin, submaksimal dayanıklılığın başarıyla gösterilmesinde en önemli sınırlayıcı faktör olduğu düşünülmektedir (Hagerman 1992). Bu nedenle, günlük alınan karbonhidrat, atletik performans

üzerine yapılmış birçok ergojenik destek araştırmalarından biridir (Walberg-Rankin 1995).

Egzersiz yaptırılan ve yaptırılmayan sıçanlarda MEL'in karbonhidrat ve lipit metabolizması üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (Mazepa ve ark 2000) hayvanlar, bir kemirici treadmill'ında, yoruluncaya kadar koşturulmuş ve egzersizin önemli bir hipoglisemiye, laktat ve beta-hidroksibütiratın plazma seviyelerinin artmasına neden olduğu, kas ve karaciğerde ise önemli glikojen azalmasına neden olduğu bulunmuştur. Ancak egzersiz yaptırılmayan hayvanlarda kas ve karaciğer glikojen içeriğinin yükseldiği, plazma serbest yağ asidinin azaldığı bildirilmiştir. MEL uygulanmış egzersiz yaptırılan sıçanlarda kas ve karaciğer glikojen içeriği önemli derecede yüksek, buna karşılık plazma ve karaciğer laktat ve plazma beta-hidroksibütirat önemli derecede düşük bulunmuştur. Bu veriler MEL'in egzersiz yaptırılan sıçanlarda glikojen depolarını karbonhidrat ve lipit kullanımındaki değişiklikler vasıtasıyla koruduğu şeklinde yorumlanmıştır. Sonuç olarak, glikojenin olumlu etkisinin, potansiyel dayanıklılık kapasitesini arttırabildiği bilinmektedir (Mazepa ve ark 2000).

Yetişkin erkeklerde oral yolla melatonin alımından sonra yapılan dayanıklılık egzersizinin fizyolojik cevabını inceleyen bir çalışma (Mero ve ark 2006), melatonin verilmesinin gün boyunca maksimal sıçrama kapasitesi veya maksimal dayanıklılık üzerine hiçbir akut (1–2 saat) etkisinin olmadığını göstermiştir (Mero ve ark 2006).

Bir başka çalışmada (Bartness ve ark 1985) 14 hafta boyunca Suriye hamsterlerine melatonin verilmezken Sibirya hamsterlerine melatonin verilmiş ve koşu çarkında egzersize tabi tutulmuştur. 14 hafta boyunca hamsterlerin egzersiz sırasında enerji alımı, depolanması ve harcanması arasındaki ilişki incelenmiştir. Sonuç olarak melatonin verilmemiş Suriye hamsterlerinde besin alımıyla egzersizin vücut ağırlığını artırdığı, melatonin verilen Sibirya hamsterlerinde ise egzersizi artırmalarına rağmen besin alımı artarken vücut ağırlığının dengede kaldığı tespit edilmiştir (Bartness ve ark 1985).

1.4. Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

Oksijen dünya atmosferinin %21'ini oluşturur ve aerobik organizmaların hayatlarını devam ettirebilmeleri için gereklidir. Bununla beraber, oksijenle ilgili

temel paradoks belli durumlarda organizmanın hayati dokuları için öldürücü olmasıdır. Solunumla alınan oksijenin çoğunluğu ATP üretiminde kullanılır. Bununla beraber solunumla alınan oksijenin nispeten büyük bir kısmı (yaklaşık %5), çoğu aşırı derecede toksik olan serbest radikallere dönüştürülür (Beyer ve ark 1998).

Serbest radikaller bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküllerdir (Akkuş 1995). Bu serbest radikaller hidroksil radikali (HO^-), hidrojen peroksit radikali (H_2O_2), superoksit anyon radikali (O_2^-), ya da singlet oksijen radikali (O_2) adı verilen toksik maddelerdir (Ianas ve ark 1991). Bu radikallerden "hidroksil radikali" hücre zarında bulunan membran fosfolipidleri ile "lipid peroksidasyonu" isimli reaksiyona girmek suretiyle, malondialdehit (MDA) adı verilen bir ürünün oluşmasına neden olur. Oksidatif stres adıyla da bilinen bu reaksiyon sonucu, hücre membranının stabilitesi bozulur ve hücre içinde fazla miktarda kalsiyum birikmesi sonucu hücre ölümü gerçekleşir (Tan ve ark 1993).

Egzersizde MDA, oksidatif stres markeri olarak sıkça kullanılır. Bununla birlikte ROS, protein ve DNA'yı okside ederek daha ileri hasara neden olur (Urso ve Clarkson 2003).

Serbest radikaller ve oksijenin radikal olmayan türevleri reaktif oksijen türleri (ROS) olarak isimlendirilirler. ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS), bütün aerobik organizmalar tarafından metabolik süreçler sonucu üretilen serbest radikal ürünleridir (Urso ve Clarkson 2003).

ROS lipidler, proteinler ve DNA üzerine pro-inflamatuar etkilerinin yanında zararlı etkilere de sahiptir. Proteinlerdeki oksidatif hasar aminoasit yan zincirlerinin oksidasyonuna ve polipeptidlerin parçalanmasına neden olur (Bloomer ve ark 2004). Hasar, yapısal değişiklere de yol açıp enzim aktivasyonunu bozabilir; örneğin, hidrojen peroksitin neden olduğu SOD inaktivasyonu ve HOCl (hipoklorik asit)'in neden olduğu α-1 proteinaz- inhibitör inaktivasyonu (Urso ve Clarkson 2003). ROS ve RNS bağlantılı hasar, DNA'da (hem mitokondrial hem de çekirdek DNA'sında) tek baz modifikasyonlarına ve her iki dizide parçalanmalara neden olmak suretiyle mutasyona yol açabilir (Bloomer ve ark 2004).

1.4.1. ROS ve RNS'nin Etkilerine Karşı Hücredeki Koruma Sistemi

Serbest radikallerin hücredeki üretimi o kadar fazladır ki, ani yıkımlar ve ölümden kaçınmak için hücrede bir korunma sisteminin varlığı gerekmektedir. Çok sayıda korunma/savunma süreci tanımlanmıştır.

Birinci basamak endojen serbest radikal üretiminin azaltılmasıdır; bu durum mitokondriden serbest radikal sızıntısının azaltılmasıyla sağlanır.

İkinci basamak metabolik hızın azaltılmasıdır.

Üçüncü basamak oksidatif stres hasarında anahtar hedeflerin dirençlerinin arttırılmasıdır.

Dördüncü basamak antioksidanlar tarafından temizlenmek üzere serbest radikallere karşı korumanın arttırılmasıdır (Cutler ve ark 2005).

Hücreler normal fizyolojik koşullarda, serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Bu sistemler şu şekilde sınıflandırılabilir:

A. Enzimatik Antioksidanlar: Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S-Transferaz (GST).

B. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar: C vitamini, A vitamini, E vitamini, flavinoidler, melatonin, ürik asit, haptoglobulin, albumin, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, ferritin, oksipurinol, ubikinon (koenzim Q10), bilirubin, mannitol, lipoik asit ve hemopeksin (Halliwell ve ark 2000).

Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir.

Beşinci basamak tamir, geri dönüşüm ve yeniden şekillendirme sürecidir.

Altıncı basamak ise hücrede nükleik asit, protein ve lipid unsurları için tamir sürecidir (Cutler ve ark 2005).

1.5. Egzersiz, Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

Oksijen tüketiminin artması serbest radikal üretiminde artışa yol açar. Oluşan bu serbest radikaller enzimatik ve nonenzimatik antioksidanları içeren bir savunma sistemi tarafından etkisiz hale getirilir. Egzersiz, ROS ve antioksidanlar arasında oksidatif stres olarak adlandırılan bir dengesizlik oluşturur (Urso ve Clarkson 2003).

1.5.1. Akut Egzersizde Oksidatif Stres

Akut egzersizin, özellikle yüksek şiddette yapıldığı zaman oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir. Akut aerobik egzersizde oksidatif stresle bağlantılı iki mekanizma bulunmaktadır:

a) VO_2 istirahat seviyelerinin 10-15 kat üzerine çıktığı zaman kütle olayı etkisiyle prooksidan aktivite artar.

b) Antioksidan aktivite prooksidanlarla kıyaslandığında yetersizdir (Alessio ve ark 2000).

Fiziksel aktivite serbest radikal üretimini birçok yolla artırır (Deaton ve ark 2003):

1. Egzersizde oksijen tüketimi birçok kat artar. Mitokondrial elektron transfer zincirinden elektron sızıntısı süperoksit anyonu üretiminde artışla sonuçlanır.
2. Şiddetli egzersizde aktif kaslar hipoksik olabilir. İskemide anaerobik metabolizmayla ksantin üretilir ve ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza (XO) dönüştürülür. Reperfüzyonda ise, artan oksijen yüklemesinin sonucunda XO hipoksantini ürik asite dönüştürür ve süperoksit oluşumunda elektron alıcısı olarak oksijen kullanır.
3. Egzersiz sonucunda oluşan doku hasarı daha sonra NADPH oksidaz tarafından serbest radikal üretimi ile nötrofil gibi inflamatuar hücrelerin aktivasyonuna neden olabilir.
4. Egzersiz esnasında katekolamin konsantrasyonu artar ve bu da ROS'un otooksidasyonuna yol açar.
5. Egzersizin neden olduğu hipotermi oksidatif hasara neden olabilir.
6. Oksihemoglobin methemoglobine otooksidasyonu egzersiz ile artabilir, bu da süperoksit üretimiyle sonuçlanır.

1.5.2. Akut Egzersizde Lipit Peroksidasyon ve Antioksidan Sistem

Sıçanlarda kısa süreli ve şiddetli egzersizin lipid ve protein oksidasyonuna neden olduğu bulunmuştur (Radak ve ark 1998). Ayrıca akut egzersizin sıçan kalbi antioksidan enzim aktivitesinde, kronik egzersizin yaptığından daha yüksek bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (Somani ve ark 1995). Antioksidan durumu egzersizin tipine ve organa bağlı olarak büyüklük ve yön açısından farklılıklar gösterir. Farklı egzersiz tiplerinin farklı seviyelerde oksidatif hasarla sonuçlandığı bilinmektedir (Liu ve ark 2000).

Yoğun egzersiz kas hasarına ve takiben inflamasyona cevap olarak nötrofil aktivasyonuna ve nötrofiliye sebep olabilir (Umegaki ve ark 2000).

Liu ve ark (2000) akut egzersizin karaciğer MDA içeriğinde ve glutamin sentetaz aktivitesinde artışa yol açarken herhangi bir organın protein karbonil seviyelerinin değişmediğini göstermişlerdir. Böbrekte MDA, protein karbonil seviyeleri veya glutamin sentetaz aktivitesi herhangi bir egzersiz tipiyle değişmemiştir. Organlar arasındaki farklılık oksijen tüketimi, oksidanlara ve antioksidan enzim aktivasyonuna duyarlılık, antioksidan seviyeleri ve diğer tamir mekanizmaları gibi birçok faktöre bağlı olabilir. Kalp ve kas oksidatif strese karaciğer ve beyin gibi organlardan faklı cevap verir görünmektedir; bu muhtemelen mitokondrial biyogenesisteki farklılıktan dolayıdır (Liu ve ark 2000).

Akut egzersiz beyin koenzim Q10, karaciğer sistein ve sistin ve yavaş kas askorbik asit seviyelerinde azalmaya, kalp GSH ve askorbik asit seviyelerinde artışa neden olur (Liu ve ark 2000). Bir başka çalışmada, Quindry ve ark (2003) maksimal egzersizden hemen sonra askorbik asit ve ürik asit seviyelerinin önemli ölçüde düştüğünü bulmuşlardır.

1.5.3. Düzenli Egzersizde Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma

Antrenmansız erkeklere 12 haftalık yorucu bir dayanıklılık antrenman programından önce ve sonra bisiklet ergometresinde egzersiz yaptırılmış ve yüksek şiddetteki dayanıklılık antrenmanının eritrositlerdeki antioksidan enzim aktivitelerini (SOD, GPX), artırdığı, tüketici egzersize cevap olarak nötrofillerden süperoksit üretimini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca antioksidan savunma sistemindeki bu

upregülasyonun eritrosit membranında egzersizin neden olduğu lipid peroksidasyonundaki azalma ile sonuçlandığı ortaya konmuştur (Miyazaki ve ark 2001).

Düzenli egzersiz, akut egzersiz etkisiyle oluşan oksidatif stresi azaltmak için adaptasyona neden olabilir. Antrenmana cevap olarak antioksidan enzim aktivitesinin artması, sistemin reaktif oksijen ve nitrojen türlerine karşı korumayı kolaylaştırmak için antioksidan oluşturma ihtiyacından dolayıdır. Çok hafif egzersiz adaptasyon sağlamada başarısız olur, çünkü oluşan reaktif oksijen ve nitrojen türleri antioksidan savunma sistemi tarafından yeterince elimine edilir. Yeterli şiddet ve sürede tekrarlanan egzersizlerin biriken etkilerinin sonucunda adaptasyon gerçekleşir. Özetle, aerobik antrenmanlar egzersizin neden olduğu oksidatif stresi baskılamaya ilaveten antioksidan üretimini de uyarır (Bloomer ve ark 2004).

Düzenli antrenmanın, SOD ve GPX gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarak oksidatif stresin zararlı etkilerini ortadan kaldırdığı gösterilmiş, bu upregülasyonun, antioksidan enzimlerin mitokondrial biyosentezini uyaran serbest radikal miktarındaki artışın sonucu olduğu bildirilmiştir (Greathouse ve ark 2005).

Dayanıklılık antrenmanlarının GPX gibi bazı antioksidan enzim aktivitelerini tekrar düzenleyerek eritrositlerde ağır akut egzersizin neden olduğu oksidatif stresi önlemek adına faydalı olabileceği gösterilmiştir (Oztasan ve ark 2004). Benzer bir çalışmada iki temel antioksidan enzim olan mitokondrial SOD ve sitozolik GPX aktivitesi antrenman yapan hayvanlarda yapmayanlara göre önemli ölçüde yüksek bulunmuş, CAT ve sitozolik SOD'da ise küçük bir farklılık gözlenmiştir (Leeuwenburgh 2001).

1.6. Melatoninin Takviyesinin Serbest Radikal Giderici Etkisi

MEL'in bir antioksidan olduğu, literatürde ilk kez 1991 yılında Ianas ve ark tarafından öne sürülmüş ve daha sonra yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarla desteklenmiştir. Bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, MEL'in antioksidan özelliği üç ana başlık altında toplanmıştır (Yazıcı ve Köse 2004).

1. Direkt antioksidan etki: MEL'in $HO^{\cdot}$, H_2O_2, O_2, HOCl (hipoklorik asit), NO (nitrik oksit), $ONOO^{-}$ (peroksinitrit) gibi oksidatif strese yol açabilen serbest

radikalleri detoksifiye ettiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebildiği bildirilmektedir (Beyer ve ark 1998).

MEL'in $HO^{\cdot}$ radikalini nötralize etme kapasitesinin GSH (glutatyon)'dan 5 kat ve mannitolden 15 kat fazla olduğu ileri sürülmüştür (Tan ve ark 1993).

2. Antioksidan enzim aracılı etki: Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki MEL'in, SOD, GPX, GR, glukoz 6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) ve glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir (Beyer ve ark 1998).

MEL'in bir başka avantajı, diğer antioksidanların aksine çok yüksek dozlarda (300mg/gün) ve uzun süre kullanımda (5 yıla kadar) bile toksik bir etkisinin olmamasıdır (Reiter 1993). Ayrıca bazı antioksidanlar belli oranda prooksidan aktiviteye sahip oldukları halde melatoninin böyle bir etkisi yoktur. MEL'in hücre çekirdeğine girebilmesi onun DNA'yı oksidatif hasardan koruması bakımından diğer antioksidanlara oranla çok daha üstün bir özelliğini teşkil eder (Akkuş 1995). Antioksidan olarak MEL nüklear DNA'yla birlikte membran lipidlerini ve muhtemel sitosolik proteinleri oksidatif hasara karşı korumada etkilidir (Reiter ve ark 1997).

MEL, insanlarda yapılan çalışmalarda, 0,1 mg'dan 2000 mg'a kadar değişen çok geniş bir doz aralığında uygulanmıştır. Hayvan çalışmaları ile de uyumlu olan bu geniş doz aralığı düşük toksisitenin göstergesidir. 0,5 mg'ın üzerindeki dozlar, farmakolojik doz olarak kabul edilir ve endojen pik seviyelerinin üzerinde bir serum konsantrasyonuna neden olur (Sack ve ark 1998).

MEL'in antioksidan etkisinin gözlenebilmesi için gereken konsantrasyonların, gece pik serum konsantrasyonlarına göre, oldukça yüksek olduğu iddia edilmektedir (Brzezinski 1997).

3. Prooksidan enzim aracılı etki: MEL'in bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir (Beyer ve ark 1998). İn vivo ve in vitro şartlarda, NO ve daha ileri aşamada $ONOO^{-}$ oluşumuna neden olan nitrik oksit sentaz (NOS)

aktivitesinin, fizyolojik MEL konsantrasyonlarında inhibe edildiği bildirilmektedir (Bettahi 1998).

Hem in vivo hem in vitro deneylerde MEL'in, iskemi-reperfüzyon, paraquat, yoğun egzersiz, L-sistein, potasyum siyanid, karbon tetraklorid vb. tarafından indüklenen lipid peroksidasyonu engellediği; benzer şekilde, iyonize radyasyon, karsinojen safrol, lipopolisakkarit ve kainik asit gibi serbest radikal etkenlerinin neden olduğu DNA'daki oksidatif hasarı inhibe ederek hücre, doku ve organları koruduğu; rapor edilmiştir (Reiter ve ark 1997).

Ayrıca MEL'in, patogenezinde serbest radikal hasarı olduğuna inanılan Alzheimer hastalığı (Reiter ve ark 1997), sepsis (Gitto ve ark 2001), hiperbarik oksijen etkisiyle oluşan oksidatif stres (Dündar ve ark 2005) gibi patolojilerde, oksidatif hasarı azalttığı bildirilmektedir.

Sıçanlara 60 dakikalık treadmill egzersizine tabi tutulmadan 30 dakika önce kg başına 1.0 mg MEL verilmesi kaslarda akut egzersiz nedeniyle oluşan oksidatif hasara karşı MEL'in potansiyel koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Alonso ve ark 2006). Buna benzer bir çalışmada yüzme egzersizinin sıçanlarda karaciğer ve iskelet kasları üzerinde oksidatif strese yol açtığı ancak MEL'in özellikle kasta oksidatif strese karşı kısmi koruma sağladığı belirtilmiştir (Hara ve ark 1996).

MEL'in oksidatif strese maruz bırakılan eritrositlerin içine girmek suretiyle hücreyi koruduğu saptanmıştır (Ianas ve ark, 1991).

Kronik böbrek yetmezliği etkisiyle oluşan oksidatif hasarı inceleyen bir çalışmada, plazmada meydana gelen MDA artışıyla beraberinde gelen SOD, CAT, GPX aktivitelerindeki azalmayı MEL uygulamasının tersine çevirdiği belirtilmiştir. (Sener ve ark 2004). Ayrıca, streptozotosin etkili diabetik sıçanlarda da MEL takviyesi, SOD ve GPX antioksidatif enzimlerinin aktivitesini ve total antioksidatif kapasiteyi arttırarak oksidatif stresi azaltmıştır (Klepac ve ark 2006).

Sonuç olarak, MEL direk bir serbest radikal süpürücü olarak etki eder ve hem reaktif oksijen hem de reaktif nitrojen türlerini detoksifiye eder. Ayrıca indirek olarak da antioksidatif savunma sistemlerinin aktivitesini artırır (Anisimov 2003).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Hayvan Sağlanması

Çalışma protokolü Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurulunun 24.04.2007 tarih ve 2007-12 sayılı kararı ile onaylandı. Çalışmamızda Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen ortalama ağırlıkları 250-300 gr olan 50 erkek Sprague Dawley sıçan kullanıldı. Tüm sıçanlar 10 haftalıktı.

2.1.2. Test Öncesi Şartlar

Sıçanlar çalışma boyunca iklim kontrollü odalarda, 20±1 derece sıcaklıkta % 45 rölatif nem ve 12/12 saat ışık periyodunda barındırıldı. Sıçanlar polikarbonat malzemeden yapılmış Tip 4 standardında (Tekniplast) kafeslerde ve her kafeste 5 sıçan olacak şekilde barındırıldı. Yem ve su ad-libitum verildi. Yem olarak Purina markalı standart sıçan yemi kullanıldı. Çeşme suyu her gün taze olarak verildi.

2.1.3. Grupların Oluşturulması, Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması

MEL 2,5 mg/1 ml çözücü (alkol) bulunacak şekilde çözündü. Sıçanlar randomize olarak 5 eşit gruba ayrıldı. Her bir grupta on sıçan olmak üzere kontrol ve deney grupları oluşturuldu. Yirmi sıçana 10 gün boyunca 10 mg/kg i.p. MEL verildi. MEL uygulaması sabah saat 10.00'da yapıldı. Toplam beş gruba uygulanan işlemler şunlardır.

1. Kontrol grubu: Hiçbir işlem yapılmadı.

2. Hafif egzersiz grubu: Koşu bandında 20 m/dk hızda 30 dk egzersiz yaptırıldı.

3. MEL-hafif egzersiz grubu: 10 gün süreyle i.p 10 mg/kg MEL uygulamasından sonra koşu bandında 20 m/dk hızda 30 dk egzersiz yaptırıldı.

4. Ağır egzersiz grubu: Koşu bandında 30 m/dk hızda 30 dk egzersiz yaptırıldı.

5. MEL-ağır egzersiz grubu: 10 gün süreyle i.p 10 mg/kg MEL uygulamasından sonra koşu bandında 30 m/dk hızda 30 dk egzersiz yaptırıldı.

Çalışma sonunda 30 mg/kg dozunda ketamin ve 5 mg/kg dozunda ksilazin kombinasyonu ile i.m anestezi uygulandı. Anestezi altında sıçanlardan intrakardiyak kan örnekleri alınarak hipovolemik şok oluşturuldu. Servikal dislokasyon yapılarak ötenazi uygulandı ve doku örnekleri alındı.

2.1.4. Kan ve Doku Örneklerinin İncelenmesi

Çalışma sonunda sıçanların kalbinden intrakardiyak yoldan 5 ml'ye yakın kan alındı. Kan iki EDTA'lı tüpe eşit olarak bölünerek ve 3000 devirde 10 dakika santrifüje edildi, elde edilen plazma ependorflara eşit olarak bölüştürüldü. Numuneler analiz edilinceye kadar -82 ^{o}C'de saklandı. Doku örnekleri alınır alınmaz etrafındaki diğer doku parçacıkları, kan ve pıhtı gibi olumsuzluklardan temizlendi, biyokimyasal analiz öncesinde soğuk zincire dikkat edilerek homojenize edildi. Kan ve doku homojenatlarında protein, MDA, XO, SOD, NO analizleri çalışılırken ayrıca doku homojenatlarında protein analizi de gerçekleştirildi.

Kullanılan Cihazlar

a. Ultrasonic homojenizatör
b. Soğutmalı santrifüj: Hettich Universal 30 RF
c. Spektrofotometre : Shimadzu UV - 1601
d. Ayarlanabilir otomatik pipetler
e. Vorteks
f. Benmari
g. Hassas terazi
h. Manyetik karıştırıcı ve manyetik bar

Kullanılan Reaktif ve Çözeltiler

Lowry metodu reaktifleri

a. $CuSO_4.5H_2O$
b. Trisodium citrate dihydrate
c. Na_2CO_3
d. NaOH
e. Folin – Ciocalteu's Phenol reaktifi

MDA reaktifleri

a. % 0,675'lik TBA çözeltisi

b. %10'luk TCA

c. 1,1,3,3-tetramethoxypropane

XO reaktifleri

a. Fosfat tamponu (50 mM, pH 7,5)

b. 4 mM xanthine

c. TCA (%100 w / v)

SOD reaktifleri

a. 0,3 mmol / L xanthine

b. 0,6 mmol / L EDTA

c. 150 µmol / L NBT

d. 400 mmol / L Na_2CO_3

e. 1 g / L bovine serum albumin

f. 0,8 mmol / L $CuCl_2$

g. 2 M $(NH_4)_2SO_4$

h. 167 U / L xanthine oxidase

i. 150 mM NaCN

NO reaktifleri

a. Kadmiyum granülleri

b. Glisin-NaOH tamponu (pH 9.7)

c. Sülfanilamid (%1)

d. N-Naphthylethylene daimine (200mg/L)

e. 5 mmol/L $CuSO_4$

f. 0.1 mol/L H_2SO_4 Solüsyonu

g. Standart solüsyonu($NaNO_2$ ve $Na_2B_4O_7$ ile)

h. 75 mmol/L $ZnSO_4$

i. 55 mmol/L NaOH

Dokuların homojenizasyonu

Analiz gününe kadar – 82 ^{0}C' de saklanan plazma ve dokular, çalışma günü derin dondurucudan çıkarılıp kuru buz ortamında laboratuara getirildi. Homojenizasyon ve analiz öncesinde doku ve plazma örnekleri çözüldü.

Tek kullanımlık özel plastik tüplere aktarılan yaklaşık 0.30-0.40 gramlık doku üzerine önce 2 ml Tris – HCl tamponu eklendi. Bu tüpler buz doldurulmuş cam beher içerisindeyken ultrasonik homojenizatör ile 2 dakika sürede doku homojenizasyonu sağlandı. Bu süre içerisinde son hacim doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon ilaveleri yapıldı. Homojenattan MDA, NO ve protein analizleri için yeterli olacak kadar numune ayrıldıktan sonra kalan homojenat +4 ^{0}C'de 30 dakika süre ile santrifüj edildi. Supernatandan XO, ve protein analizleri için yeterli olacak kadar miktar alındıktan sonra kalan supernatanlar SOD analizi için kullanılır. Bu son homojenattan alınan miktar ile eşit hacimde Kloroform/Etanol karışımı (3/5 oranında) aynı tüpe konup vortekslendi. Daha sonra 3220 rpm / 40 dakika +4 ^{0}C'de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzim aktivite tayini yapıldı.

Protein ölçümü

Proteinlerin ölçümü Lowry Metodu ile yapıldı. Alkali çözeltide bakır – protein kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks Folin – Ciocalteu – Phenol reaktifini redükler ve koyu mavi bir renk oluşturur. Buradaki renk koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

Protein ölçümü için değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış olan protein standart solüsyonlarından faydalanılarak bir standart grafiği elde edildi. Çalışmalar için kör ve numune tüpleri hazırlandı. Numune tüpüne 10 µl numune ile 490 µl distile su ve kör tüpüne 500 µl distile su koyulduktan sonra üzerlerine 2,5 ml C reaktifi (A ve B reaktiflerinin 1/50 oranında karışımı) eklenip 10 dakika oda ısısında bekletildi. Tüplere 250' şer µl D reaktifi (Folin – Ciocalteu's Phenol reaktifi) konulup hızla vortekslendi. 30 dakika oda ısısında bekletildi. Bekleme süresinin sonunda 700 nm de köre karşı absorbansları alındı. Sonuçlar standart grafiğinden mg/mL cinsinden hesaplandı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kullanılan Analiz Yöntemleri

MDA ölçümü

MDA seviyeleri tiobarbitürik asit (TBA) reaktivitesi yöntemi kullanılarak ölçüldü (Hammouda ve ark 1995). Yağ asidi peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek sıcak ve alkali ortamda, 532 nm'de maksimum absorbans veren renkli kompleks oluşturur. Oluşan kompleksin okunan absorbansından faydalanılarak MDA değerleri elde edilir.

Numune ve deney tüpleri hazırlandı. Tüplere 2,5 ml % 10'luk (w/v) TCA çözeltisi konduktan sonra kör tüpüne 0,5 ml distile su, numune tüpüne ise 0,5 ml numune konularak vorteksle karıştırıldı. Tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra 90 ^{0}C'lik su banyosunda 15 dakika bekletildi. Tüpler soğutulduktan sonra 3000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatanlardan 2 ml alınıp üzerine % 0,675'lik (w/v) TBA çözeltisinden 1 ml eklendi. Tekrar 90 ^{0}C lik su banyosunda 15 dakika bekletildikten sonra tüpler soğutuldu. Her numunenin 532 nm de köre karşı absorbansları okutuldu.

1,1,3,3-tetramethoxypropane'nın değişik konsantrasyonları ile hazırlanan standart grafiğinden faydalanılarak MDA düzeyleri plazma için nmol/ml, dokular için nmol/g protein olarak hesaplandı.

XO ölçümü

XO aktivitesi Prajda ve Weber'in (1975) metoduna göre çalışıldı. Bu metot numunede bulunduğu farz edilen XO'ın ortamdaki ksantinden ürik asit oluşturması esasına dayanır. Oluşan ürik asit miktarı % 100'lük TCA solüsyonu eklenmesi ile sabitlenir.

Her bir numune için ayrı ayrı olacak şekilde numune ve kör tüpleri hazırlandı. Tüm tüplere EDTA'lı fosfat tamponundan 1680 µL ve ksantin solüsyonundan 30 µL pipetlendi. Ardından numune tüplerine 30'ar µL numuneler pipetlendi. 37˚C'de 30 dakika inkübasyonun arkasından numune tüplerindeki reaksiyon 84 µL TCA ilavesi ile durduruldu. Kör tüplerine de önce 30'ar µL numune ve hemen beklenmeden 84 µL TCA pipetlenip vortekslendi. 4000xg'de 20 dakika santrifüj sonu süpernatanların

293 nm dalga boyunda distile suya karşı absorbansları okundu. Böylece 30 dakika içerisinde üretilen ürik asit miktarı belirlendi ve sonuçlar NOD / St OD x standart toplam μM sayısı x 1 / 30 dakika x 20 (dilüsyon faktörü) formülünden faydalanılarak plazma için U/ml, dokular için U/g protein olarak hesaplandı.

Ksantin →XO→ ürik asit

SOD ölçümü

SOD aktivite analizi Sun ve arkadaşlarının (1988) metoduna göre gerçekleştirildi. Yöntem ksantin / ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgenmesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri (O_2) ortamdaki NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgenme meydana gelip mavi–mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi olmayıp mavi–mor renk meydana gelmemekte ve enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır.

Kör ve numune tüpleri hazırlandı. Tüm tüplere 1425 μL ASSAY reaktifinin ardından numune tüplerine 50 μL ekstrakt (Etanol fazı) ve kör tüpüne 50 μL distile su pipetlendi. Tüm tüplere 25'er μL XO enzimi ilavesi ile tüpler alt üst edilip 25 ^{0}C'de 20 dakika inkübasyondan sonra hemen tüm tüplere 500'er μL $CuCl_2$ ilavesi ile reaksiyonlar durduruldu. Distile suya karşı körden başlanarak 560 nm'de absorbanslar okundu ve sonuçlar plazma için U/ml, dokular için U/mg protein olarak verildi.

Enzimin % inhibisyonu = ($Abs_{kör}$ – Abs_{num}) / ($Abs_{kör}$ x 100) Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. % 50 inhibisyonu gerçekleştiren enzim aktivitesi U olarak hesaplandıktan sonra U/ml değerine çevrilerek verilir.

%50 inhibisyon = (% İnhibisyon / 50) x 1 / F = U / mL

NO ölçümü

Vücutta endojen olarak üretilen nitrik oksitin doku ve vücut sıvılarındaki konsantrasyonu, pek çok çalışmada nitrit ve nitrat olarak belirtilmektedir (Lit NO_1). Çünkü nitrik oksit, üretildiği bölgede saniyeler içinde okside olarak önce nitrite (NO_2^-) daha sonra da nitrata (NO_3^-) dönüşebilmektedir. Bununla beraber proteinden zengin homojenat, serum ve plazma gibi solüsyonlarda spesifik olmayan reaksiyonlar olabileceğinden, Griess reaksiyonu ile gerçekleştirilecek analizlerde bazı sıkıntılar yaşanmaktadır. Bu açıdan biz nonspesifik reaksiyonların önüne geçebilmek için numunelerin önce deproteinize edilmesini sağladıktan sonra nitrit ve nitrat konsantrasyonlarını ölçtük. Zor olmakla birlikte *in vivo* olarak direkt NO ölçümü de mümkündür. Bu amaçla NO propları geliştirilmiştir ama bunların *in vitro*/*ex vivo* şartlarda çalışılması mümkün değildir (Lit NO_2).

Dokuda nitrit ve nitrat miktarı deproteinizasyondan sonra Griess reaksiyonu ile belirlenir (Lit NO_3). Total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile değerlendirildi. pH 9.7 glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmiyum granüllerinin deproteinize numune süpernatantı ile 90 dakikalık inkübasyonu sonunda nitrat redüksiyonu sağlandı. Üretilen nitritin; sülfanilamid ve buna bağlı N-naphthylethylene diaminle (NNDA) diazotizasyonuyla reaksiyonu sonucunda oluşan pembe rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu ve sonuçlar plazma için nmol/L, dokular için nmol/g yaş doku olarak hesaplandı.

2.3. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistik analizi bilgisayarda SPSS 15.0 for Windows programı ile yapıldı. Bulgular ortalama±standart sapma (SS) şeklinde verildi. P değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi. Gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis varyans analizi ile yapıldı. Farklılık bulunması ($p<0.05$) halinde Bonferroni düzeltmeli (α/test sayısı) Mann-Whitney U testi yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Melatonin Kullanımıyla Beyin ROS Aktivasyonunda (MDA, NO, XO) ve Antioksidan Enzimlerde (SOD) Meydana Gelen Değişiklikler

Beyin NO düzeyi sadece, melatonin verilerek hafif egzersiz yaptırılan grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 1).

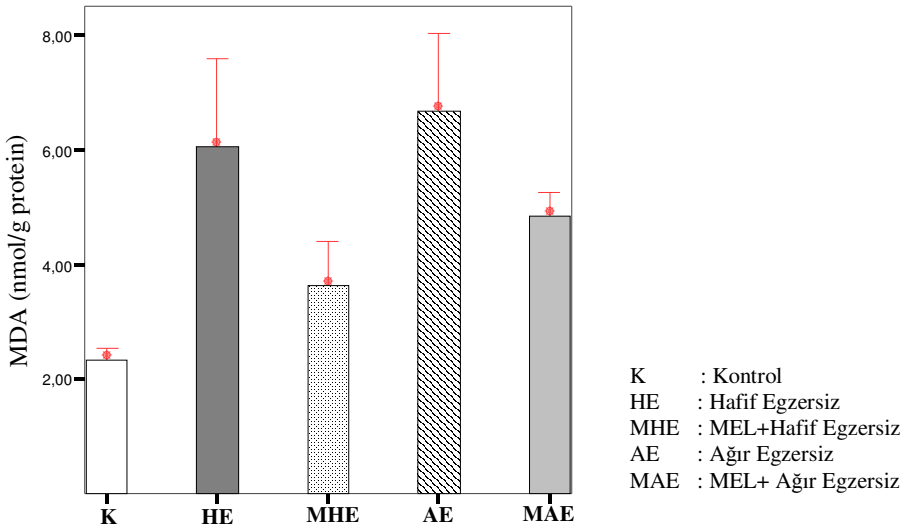
Beyin MDA düzeyi ise, hafif egzersiz, ağır egzersiz ve melatonin verilerek ağır egzersiz yaptırılan grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, beyin MDA değeri melatonin verilerek hafif egzersiz uygulanan grupta hafif egzersiz yapan sıçanlara oranla önemli ölçüde düşük bulundu. Melatonin uygulanarak hafif egzersiz yaptırılan grupta ağır egzersiz grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Tablo 1, Grafik 1).

Beyin XO düzeyi hafif egzersiz, ağır egzersiz ve melatonin uygulanan ağır egzersiz grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 1).

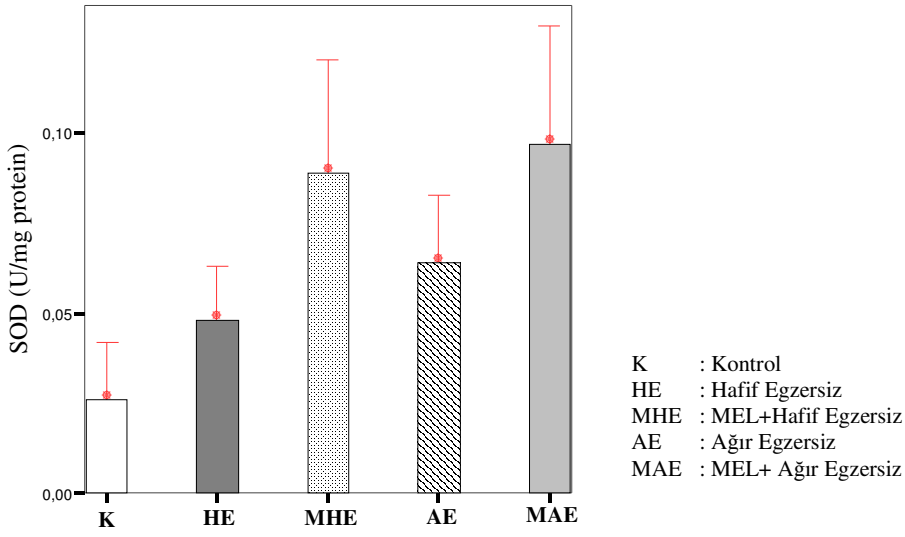
Beyin SOD düzeyleri melatonin verilerek hafif egzersiz yaptırılan, ağır egzersiz, melatonin verilerek ağır egzersiz yaptırılan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 1, Grafik 2).

Gruplar	NO (nmol/g yaşdoku)	MDA (nmol/g protein)	XO (U/g protein)	SOD (U/mg protein)
Kontrol	0.14±0.13	2.34±0.28	0.08±0.04	0.03±0.02
Hafif Egzersiz	0.34±0.20	6.07±2.14 [a]	0.28±0.12 [a]	0.05±0.02
MEL+Hafif Egzersiz	0.41±0.17 [a]	3.63±1.09 [b]	0.21±0.13	0.09±0.04 [a]
Ağır Egzersiz	0.22±0.11	6.68±1.89 [a c]	0.42±0.29 [a]	0.06±0.03 [a]
MEL+Ağır Egzersiz	0.27±0.17	4.84±0.57 [a]	0.25±0.13 [a]	0.10±0.04 [a]
P	**0.005**	**0.000**	**0.000**	**0.000**

Tablo 1: Grupların (n=50) beyin nitrik oksit, malondialdehit, ksantin oksidaz, süperoksit dismutaz değerleri (Ort±SS [a]: Kontrole göre $p<0.05$, [b]:Hafif Egzersize göre $p<0.05$, [c]: MEL+Hafif Egzersize göre $p<0.05$).



Grafik 1: Tüm gruplara ait beyin dokusu MDA ortalamaları (nmol/g protein)



Grafik 2: Tüm gruplara ait beyin dokusu SOD ortalamaları (U/mg protein)

3.2. Melatonin Kullanımıyla Karaciğer ROS Aktivasyonunda (MDA, NO, XO) ve Antioksidan Enzimlerde (SOD) Meydana Gelen Değişiklikler

Karaciğer NO değerleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark bulunmadı (Tablo 2).

Karaciğer MDA düzeyi, hafif egzersiz, melatonin verilen hafif egzersiz ve ağır egzersiz grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 2).

Karaciğer XO düzeyi, sadece ağır egzersiz grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 2).

Karaciğer SOD düzeyi, ağır egzersiz ve melatonin verilerek ağır egzersiz yaptırılan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 2).

Gruplar	NO (nmol/g yaşdoku)	MDA (nmol/g protein)	XO (U/g protein)	SOD (U/mg protein)
Kontrol	0.21±0.11	0.65±0.38	0.61±0.28	0.47±0.30
Hafif Egzersiz	0.27±0.11	1.31±0.40 [a]	0.89±0.30	0.61±0.36
MEL+Hafif Egzersiz	0.30±0.17	1.01±0.29 [a]	0.76±0.41	0.79±0.09
Ağır Egzersiz	0.34±0.17	1.09±0.27 [a]	1.50±0.64 [a]	0.82±0.16 [a]
MEL+Ağır Egzersiz	0.39±0.18	1.08±0.44	1.24±0.74	0.93±0.15 [a]
P	**AD**	**0.002**	**0.014**	**0.002**

Tablo 2: Grupların (n=50) karaciğer nitrik oksit, malondialdehit, ksantin oksidaz, süperoksit dismutaz değerleri (Ort±SS AD: Anlamlı değil [a]: Kontrole göre $p<0.05$).

3.3. Melatonin Kullanımıyla Böbrek ROS Aktivasyonunda (MDA, NO, XO) ve Antioksidan Enzimlerde (SOD) Meydana Gelen Değişiklikler

Böbrek NO değerleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark bulunmadı (Tablo 3).

Böbrek MDA düzeyi, grupların hepsinde kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 3).

Böbrek XO ve SOD değerleri açısından gruplar arasında herhangi bir fark bulunmadı (Tablo 3).

Gruplar	NO (nmol/g yaşdoku)	MDA (nmol/g protein)	XO (U/g protein)	SOD (U/mg protein)
Kontrol	0.27±0.06	2.73±0.48	0.39±0.13	0.47±0.29
Hafif Egzersiz	0.33±0.05	5.98±1.74 [a]	0.82±0.81	0.59±0.23
MEL+Hafif Egzersiz	0.37±0.12	5.51±1.25 [a]	0.65±0.36	0.66±0.30
Ağır Egzersiz	0.31±0.02	5.66±1.31 [a]	0.58±0.18	0.51±0.27
MEL+Ağır Egzersiz	0.35±0.13	5.40±1.13 [a]	0.49±0.32	0.58±0.29
P	**AD**	**0.000**	**AD**	**AD**

Tablo 3: Grupların (n=50) böbrek nitrik oksit, malondialdehit, ksantin oksidaz, süperoksit dismutaz değerleri (Ort±SS AD: Anlamlı değil [a]:Kontrole göre $p<0.05$).

3.4. Melatonin Kullanımıyla Plazma ROS Aktivasyonunda (MDA, NO, XO) ve Antioksidan Enzimlerde (SOD) Meydana Gelen Değişiklikler

Plazma NO düzeyi hafif egzersiz yaptırılan, melatonin verilerek hafif egzersiz yaptırılan ve melatonin verilerek ağır egzersiz yaptırılan grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Ayrıca ağır egzersiz yaptırılan grupta, melatonin verilerek hafif egzersiz yaptırılan gruba oranla anlamlı fark bulundu (Tablo 4).

Plazma MDA düzeyi, grupların hepsinde kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 4).

Plazma XO düzeyi, sadece hafif egzersiz grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Tablo 4).

Plazma SOD düzeyi, ağır egzersiz yaptırılan ve melatonin verilerek ağır egzersiz yaptırılan grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Melatonin verilerek ağır egzersiz yaptırılan grupta hem hafif egzersiz grubuna hem de melatonin verilerek hafif egzersiz yaptırılan gruba oranla anlamlı fark bulundu (Tablo 4).

Gruplar	NO (nmol/L)	MDA (nmol/ml)	XO (U/ml)	SOD (U/ml)
Kontrol	30.83±5.43	0.53±0.07	0.30±0.13	2.14±1.28
Hafif Egzersiz	45.74±13.18 [a]	1.14±0.45 [a]	0.61±0.22 [a]	3.14±0.82
MEL+Hafif Egzersiz	50.08±10.93 [a]	0.91±0.34 [a]	0.52±0.24	3.38±0.94
Ağır Egzersiz	34.71±6.95 [c]	0.89±0.28 [a]	0.54±0.25	4.30±1.82 [a]
MEL+Ağır Egzersiz	39.60±5.84 [a]	0.79±0.17 [a]	0.45±0.10	5.01±1.04 [a b c]
P	**0.002**	**0.000**	**0.016**	**0.000**

Tablo 4: Grupların (n=50) plazma nitrik oksit, malondialdehit, ksantin oksidaz, süperoksit dismutaz değerleri (Ort±SS [a]: Kontrole göre $p<0.05$ [b]:Hafif Egzersize göre $p<0.05$, [c]: MEL+Hafif Egzersize göre $p<0.05$).

4. TARTIŞMA

Bu tezin amacı, 30 dakika akut egzersizle oluşan lipit peroksidasyonu ve antioksidan savunmadaki değişiklikler üzerine MEL'in etkisinin belirlenmesiydi.

Çalışmanın başlıca bulgusu, sıçanlara 30 dakika hafif (20 m/dk hızda) koşu egzersizi yaptırıldığında beyin dokusunda MEL'in lipit peroksidasyon ve antioksidan savunma üzerine etkili olduğudur.

MEL direk bir serbest radikal temizleyici olarak etki eder ve hem ROS hem de RNS'yi detoksifiye eder (Anisimov 2003). Bununla birlikte MEL'in antioksidatif savunma sistemlerinin aktivitesini artırdığı da bilinmektedir (Anisimov 2003).

Kronik böbrek yetmezliği etkisiyle oluşan oksidatif hasarı inceleyen bir çalışmada MEL uygulamasının, plazmada meydana gelen MDA artışıyla birlikte görülen SOD, CAT, GPX aktivitelerindeki azalmayı tersine çevirdiği belirtilmiştir (Sener ve ark 2004).

Pinealektomi yapılan sıçanların karaciğer, akciğer ve beyin GPX aktivitelerinde anlamlı düşüşler saptanmış (Reiter 1993), ayrıca sıçanlarda sisplatinin (CP) neden olduğu nefrotoksisiteye karşı MEL'in koruyucu etkisini inceleyen bir çalışmada da, MEL'in GPX' i aktive ederek CP uygulanması sonucu oluşan lipid peroksidasyonunu engellediği belirtilmiştir (Hara ve ark 2001).

MEL'in, SOD, GPX, GR, CAT gibi birçok antioksidatif enzimin uyarıcısı olduğu bilinmektedir (Anisimov 2003). Bu bulguyu destekleyecek şekilde akut veya kronik olarak uygulanan MEL'in sıçanlarda beyin dokusu Mn-SOD ve CuZn-SOD sentezini artırdığı ve böylece beyin dokusunu oksidatif hasara karşı koruduğu gösterilmiştir (Kotler ve ark 1998).

Bununla birlikte anne sıçana verilen MEL'in plasentadan geçebildiği ve fetüs beyninde SOD aktivitesini artırdığı belirtilmiştir (Thomas ve ark 1998). Gebe bir sıçana MEL uygulanması, fetal sıçan beyninde serbest radikallerin indüklediği mitokondrial lipid peroksidasyonu önemli ölçüde düşürürken, SOD aktivitesini değiştirmeyip GPX aktivitesini büyük ölçüde artırdığı bildirilmiştir. MEL'in

oksidatif hasarı azaltıcı bu etkisi, direkt antioksidan etki ve GPX'i aktivasyonundan kaynaklanır (Wakatsuki ve ark 2001).

Bahsedilen araştırmalarda MEL uygulamasının antioksidan etkisi incelenmiştir. Egzersizin antioksidan enzim aktivitesinde değişikliğe yol açtığı sonucu ise literatürde birçok çalışmada gösterilmiştir (Vani ve ark 1990, Hara ve ark 1996, Hara ve ark 1997)

Vani ve ark (1990) 1 gün, 10 gün, 60 gün boyunca egzersiz yaptırılan sıçanların karaciğer dokusunda GST, SOD, XO, GPX, CAT ve MDA ölçümlerini değerlendirmiş, GST, SOD, XO aktivitesinin egzersiz süresinin uzamasıyla önemli derecede arttığını bildirmiştir. MDA oluşumu ile açıklanan lipid peroksidasyon da karaciğerde bu üç grubun tamamında anlamlı olarak artmıştır.

Bu çalışmada MEL'in beyin dokusunda hem hafif hem de ağır egzersizle birlikte, karaciğerde ve plazmada ağır egzersizde bir antioksidan enzim olan SOD aktivitesini artırdığını bulduk.

Bahsedilen araştırmalarda, ayrı ayrı ele alındığında MEL ve egzersizin endojen antioksidan enzimlerin aktivitesinde artmaya yol açtığı şeklindeki bulgusu, gerçekleştirdiğimiz çalışmada MEL verilen sıçanlarda egzersizden sonraki yükselmiş SOD düzeyleri şeklindeki bulgumuzu desteklemektedir. Ancak çalışmamızı karşılaştırabileceğimiz en önemli bulgu Hara ve ark (1997)'nın gerçekleştirdiği araştırmada ortaya konulmuştur. Hara ve ark (1997) sıçanlarda yüzme egzersizinin karaciğer, iskelet kası ve beyinde lipid peroksidasyonunu artırdığını bildirmiştir. Yüzmeden önce MEL takviyesi bu artışı engellemiştir. MEL takviyesi, egzersizden sonra beyinde GPX'in önemli ölçüde artmasına yol açmış ve egzersizin neden olduğu oksidatif strese karşı korumuş, ancak benzer bulgular karaciğer ve kasta gözlenmemiştir. Bu çalışmanın sonuçları, MEL takviyesi yapılan hayvanların egzersizden sonra plazma ve dokularında elde ettiğimiz artmış SOD düzeyleri ile uyumludur. Biz de çalışmamızda, MEL takviyesinin beyin dokusunda bir antioksidan enzim olan SOD aktivitesini hem hafif hem de ağır egzersizde artırdığını ve hafif egzersizle oluşan MDA artışını engellediğini bulduk. Egzersizde MDA artışı karaciğer, böbrek ve plazmada MEL ile engellenmedi. Ayrıca, SOD aktivitesinin ağır egzersizde de karaciğerde ve plazmada önemli ölçüde arttığı gözlendi.

Bir başka çalışmada, sıçanlara yaklaşık 30 dakikalık yüzme egzersizi yaptırılmasının, karaciğer ve iskelet kasları üzerinde oksidatif strese yol açtığı, ancak MEL'in özellikle iskelet kasında lipid peroksidasyon ürünlerinin (MDA ve 4HDA) artışını önleyerek oksidatif strese karşı kısmi koruma sağladığı ortaya konmuştur. Karaciğer ve beyinde GPX aktivitesi, aynı anda MEL uygulanmasından etkilenmeyerek yüzmeden sonra önemli ölçüde yükselmiş ancak bu iki dokuda hiçbir uygulama lipit peroksidasyonunu önemli derecede değiştirmemiştir (Hara ve ark 1996).

Bizim çalışmamızda da beyin, karaciğer, böbrek ve plazmada MDA seviyeleri kontrol grubuna göre hem hafif hem ağır egzersizle artmıştır. MEL uygulaması, bu çalışmadan farklı olarak hafif egzersizin oluşturduğu beyin MDA'sını düşürmüş; beyin SOD aktivitesini artırmış, karaciğer, böbrek ve plazmayı etkilememiştir. Ayrıca MEL uygulaması ağır egzersizde beyin, karaciğer ve plazmada SOD aktivitesini kontrol grubuna oranla önemli ölçüde artırmıştır.

Hara ve ark (1996) çalışmalarında deneylerindeki 30 dakikalık yüzmenin belirgin bir şekilde yoğun ancak yorucu olmadığını bildirmişlerdir. Yukarıda sonuçları sunulan raporlarla birlikte gerçekleştirdiğimiz çalışmada çeşitli dokularda farklı sonuç alınması muhtemelen egzersiz uygulamasındaki farklılıkların bir sonucu olarak değerlendirilebilir.

Yapılan bir çalışmada, antioksidan durumun egzersizin tipine ve organa bağlı olarak büyüklük ve yön açısından farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir. Farklı egzersiz tiplerinin farklı seviyelerde oksidatif hasarla sonuçlandığı bilinmektedir (Liu ve ark 2000).

Organlar arasındaki farklılık oksijen tüketimi, oksidanlara ve antioksidan enzim aktivasyonuna duyarlılık, antioksidan seviyeleri ve diğer tamir mekanizmaları gibi birçok faktöre bağlı olabilir. Kalp ve kas oksidatif strese karaciğer ve beyin gibi organlardan farklı cevap verir görünmektedir; bu muhtemelen mitokondrial biyogenesisteki farklılıktan dolayıdır (Liu ve ark 2000).

Liu ve ark (2000) akut egzersizin karaciğer MDA içeriğinde ve glutamin sentetaz aktivitesinde artışa yol açarken herhangi bir organın protein karbonil

seviyelerinin değişmediğini göstermişlerdir. Böbrekte MDA, protein karbonil seviyeleri veya glutamin sentetaz aktivitesi herhangi bir egzersiz tipiyle değişmemiştir.

Gündüze göre, gece öldürülen sıçanlarda beyin GPX aktivitesinin daha yüksek bulunması, MEL'in fizyolojik antioksidan etkisine bağlanmaktadır. Havyan modeli çalışmalarında, farmakolojik dozda uygulanan MEL ile akciğer, barsak, böbrek, karaciğer, beyin, kalp, pineal bez ve eritrosit GPX aktiviteleri, %22 ila %138 oranında artmaktadır. Sıçanlarda böbrek, karaciğer ve beyin dokusu GPX aktivitesinin MEL uygulandıktan 3 saat sonra arttığı gözlenmiştir (Pahkla ve ark 1998).

NO'in karaciğer glikoneogenezisini ve hepatositlerde glikojen sentezini engellediği bildirilmiştir. Ayrıca, iskelet kaslarında modifiye glikoz transportunu da azaltır. Melatonin ise farklı hücrelerde NO oluşumunu azaltır ve bu etki karbonhidrat metabolizmasını değiştirebilir (Mazepa ve ark 2000). İn vivo ve in vitro şartlarda, NO ve daha ileri aşamada $ONOO^-$ oluşumuna neden olan NOS aktivitesinin, fizyolojik MEL konsantrasyonlarında inhibe edildiği bildirilmektedir (Bettahi 1998).

MEL'in serbest radikal giderici etkisini inceleyen bir çalışmada, sıçanlara 60 dakikalık treadmill egzersizine tabi tutulmadan 30 dakika önce kg başına 1.0 mg MEL uygulanmış, kaslarda MEL'in NOS enzim aktivitesini inhibe ederek akut egzersiz nedeniyle oluşan oksidatif hasara karşı potansiyel koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Alonso ve ark 2006).

Bahsedilen araştırmaların sonuçları incelendiğinde Alonso ve ark (2006) MEL' in, NO oluşumunu kas dokuda engelleyerek egzersizde lipid peroksidasyon üzerine etkili olduğunu bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise NOS enzim aktivitesi ölçülmemekle birlikte plazma, beyin, karaciğer ve böbrek dokularında NO düzeyleri incelenmiş, sadece plazmada hafif egzersiz NO oluşumunu kontrol grubuna göre anlamlı olarak artırmış, diğer dokularda belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. MEL uygulaması ise plazmadaki NO oluşumunu azaltmamıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yukarıda sunulan bilgiler birarada değerlendirildiğinde MEL'in egzersizde lipid peroksidasyonunu azaltarak antioksidan etki oluşturduğu konusunda bir fikir birliğinin bulunmasına karşın, bu değişikliğin hangi dokularda ne derece etkili olduğuna dair çelişkili sonuçlar söz konusudur.

Bu çalışmadan elde edilen bulgularda; akut koşu egzersizinden hemen sonra MEL-hafif egzersiz grubunda beyin dokusunda MDA düzeyinde azalma ve SOD aktivitesinde artış, anlamlı olarak görülmüştür. MEL ve egzersiz uygulaması beyinle beraber karaciğer ve plazmada da SOD aktivitesinde anlamlı bir artış meydana getirmiştir. Sonuç olarak MEL'in hafif egzersizde beyin dokusunda lipid peroksidasyonu azaltıp antioksidan sistemi stimüle ederek etki oluşturabileceği kanaatine varılmıştır.

Çalışmamızda ortaya konulan bulguların bu konuda literatürdeki bir boşluğu doldurarak bilinenlere ilave katkılar sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sıçanlarda Melatonin Desteğinin Akut (Hafif ve Ağır) Egzersizle Çeşitli Dokularda Oluşan Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Durum Üzerine Etkileri

Sevde Harmandaro Eren

Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2008

Melatonin (MEL)'in oksidatif stres üzerine etkilerini araştıran çalışmalar bulunmasına rağmen, daha dar bir çerçevede hafif ve ağır egzersizde oluşan oksidatif stres ve antioksidan savunma üzerine melatoninin etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Bu çalışmanın amacı akut (hafif ve ağır) koşu egzersizi yaptırılan sıçanlarda melatonin uygulamasının plazma, beyin, karaciğer ve böbrekte lipit peroksidasyonu ve antioksidan durum üzerine etkilerini araştırmaktır.

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden (SÜDAM) temin edilen sıçanlar üzerinde aynı merkezde gerçekleştirildi. Sprague-Dawley cinsi 250-300 gram ağırlığında 50 adet erkek sıçan çalışma için, her grupta 10 sıçan olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Kullanılan çalışmada gruplar şu şekilde oluşturuldu:

1. Kontrol grubu: Hiçbir işlem yapılmadı.
2. Hafif egzersiz grubu: Koşu bandında 20 m/dk hızda 30 dk egzersiz yaptırıldı.
3. MEL-hafif egzersiz grubu: 10 gün süreyle i.p 10 mg/kg melatonin uygulamasından sonra koşu bandında 20 m/dk hızda 30 dk egzersiz yaptırıldı.
4. Ağır egzersiz grubu: Koşu bandında 30 m/dk hızda 30 dk egzersiz yaptırıldı.
5. MEL-ağır egzersiz grubu: 10 gün süreyle i.p 10 mg/kg melatonin uygulamasından sonra koşu bandında 30 m/dk hızda 30 dk egzersiz yaptırıldı.

Malondialdehit (MDA) değerleri kontrol grubuna göre bütün dokularda (hafif ve ağır) egzersizle arttı. MEL uygulaması sonucu, diğer dokularda MDA düzeyleri anlamlı bir değişiklik göstermezken, beyinde MEL-hafif egzersiz grubunda hafif egzersiz grubuna oranla önemli ölçüde azalma gözlendi. Ağır egzersiz ve MEL-ağır egzersiz, böbrek hariç plazma ve diğer dokularda kontrol grubuna göre süperoksit dismutaz (SOD) düzeylerini arttırdı. MEL-hafif egzersiz ise sadece beyin dokusunda kontrol grubuna göre SOD aktivasyonunu arttırmıştır. Karaciğer ve böbrek nitrik oksit (NO) değerleri açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmazken ($p>0,05$) plazma NO düzeyi, hafif egzersiz, MEL-hafif egzersiz ve MEL-ağır egzersiz grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Sonuç olarak (hafif ve ağır) egzersiz yaptırılan sıçanlarda plazma ve dokularda oksidatif stres genellikle artmıştır. Ekzojen olarak MEL verilmesinin sadece beyinde hafif egzersizle oluşan serbest radikal artışını önlerken, antioksidan savunmayı da artırdığı gözlemlenmiştir. Karaciğer ve plazmada ekzojen MEL, antioksidan savunmayı (SOD) arttırmış ancak MDA düzeyinde anlamlı ölçüde değişiklik gözlenmemiştir. Böbrekte MDA düzeyi kontrole göre artarken MEL uygulaması, bu artışı önemli derecede değiştirmemiştir.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan; egzersiz; melatonin; oksidatif stres; serbest radikaller.

7. SUMMARY

T.C.
SELÇUK UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Effects of Melatonin Administration on Acute (Light And Heavy) Exercise-Induced Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Various Tissues of Rats

Sevde Harmandaro Eren

Department of Physiology (Medicine)

MASTER THESIS / KONYA-2008

Although there are many studies investigating the effects of melatonin (MEL) on the oxidative stress, in a narrower frame there are no studies investigating the effects of melatonin on the antioxidant defense and on the oxidative stress induced by light and heavy exercise. The purpose of this study is to investigate the effects of melatonin administration on the lipid peroxidation and antioxidant status in plasma, brain, liver and kidney of light and heavy exercised rats.

The study was constructed with rats provided by Selçuk University Research and Application Center in Experimental Medicine (SUDAM) in the same center. For the study, number of 50 Sprague-Dawley male rats with weight of 250-300 g were divided into 5 equal groups each having 10 rats. The groups used in the study were formed as below:

1. Control group: No application was performed.
2. Light exercise group: Rats were exercised with 30 minutes long treadmill run with a speed of 20 m/min
3. MEL-light exercise group: After daily i.p MEL application of 10 mg/kg for 10 days, rats were exercised with 30 minutes long treadmill run with a speed of 20 m/min.
4. Heavy exercise group: Rats were exercised with 30 minutes long treadmill run with a speed of 30 m/min.
5. MEL-heavy exercise group: After daily i.p MEL application of 10 mg/kg for 10 days, rats were exercised with 30 minutes long treadmill run with a speed of 30 m/min.

Compared to the control group, malondialdehid (MDA) values were increased with exercise (light and heavy) in all tissues. After MEL application there were no significant changes in MDA values in all other tissues, but in brain the values decreased significantly in the MEL-heavy exercise group compared to the light exercise group. Compared to the control group heavy exercise and MEL-heavy exercise applications increased the superoxide dismutase (SOD) levels in plasma and other tissues except for kidney. The application of MEL-light exercise increased the SOD activation only in brain tissues when compared to the control group. No significant difference was found in liver and kidney nitric oxide (NO) values between groups ($p>0,05$) whereas, the plasma NO levels in light exercise, MEL-light exercise and MEL-heavy exercise groups were found as significantly higher than the values in the control group.

As a result, in exercised (light and heavy) rats the oxidative stress in the plasma and tissues generally increased. It was observed that the exogenous MEL application prevented the increase of free radicals induced by light exercise only in brain and increased the antioxidant defense. In liver and plasma the exogenous MEL application increased the antioxidant defense but caused no significant change in MDA level. In kidney, the MDA level increased significantly compared to the control group and MEL application caused no significant change in that increase of MDA level.

Keywords: Antioxidant; exercise; melatonin; oxidative stress; free radicals.

KAYNAKLAR

1. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. Sağlık dizisi 5. Konya. 1995; 42-3.

2. Alessio HM, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. Med Sci Sports Exerc. 2000; 32(9): 1576-81.

3. Alonso M, Collado PS, González-Gallego. Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. J Pineal Res. 2006; 41(1): 8-14.

4. Anisimov VN. Effects of exogenous melatonin. A Review, Toxicol Pathol. 2003; 31: 589-603.

5. Atkinson G, Drust B, Reilly T, Waterhouse J. The relevance of melatonin to sports medicine and science. Sports Med. 2003; 33(11): 809-31.

6. Bartness TJ, Wade GN. Body weight, food intake and energy regulation in exercising and melatonin treated Siberian hamsters. Physiol Behav. 1985; 35(5): 805-8.

7. Bettahi I, Guerrero JM, Reiter RJ, Osuna C. Physiological concentrations of melatonin inhibit the norepinephrine-induced activation of prostaglandin E2 and cyclic AMP production in rat hypothalamus: a mechanism involving inhibiton of nitric oxide synthase. J Pineal Res. 1998; 25: 34-40.

8. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant properties of melatonin-An emerging mystery. Biochem Pharmacol. 1998; 56: 1265-72.

9. Bloomer, RJ, Goldfarb AH. Anaerobic exercise and oxidative stres. A review. Can J Appl Physiol 2004; 29(3): 245-63.

10. Brzezinski A. Mechanisms of disease: Melatonin in humans. N England J Med. 1997; 336(3): 186-95.

11. Bubenik GA, Pang SF. The role of seratonin and melatonin in gastrointestinal physiology: ontogeny,regulation of food intake and mutual seratonin-melatonin feedback. J.Pineal Res. 1994; 16: 91-9.

12. Buxton OM, Frank SA, L'Hermite-Baleriaux M, Leproult R, Turek FW, Van Cauter E. Roles of intensity and duration of nocturnal exercise in causing phase delays of human circadian rhythms. Am J Physiol. 1997a; 273(3 Pt 1): 536-42.

13. Buxton OM, L'Hermite-Baleriaux M, Hirschfeld U, Cauter E. Acute and delayed effects of exercise on human melatonin secretion. J Biol Rhythms. 1997b; 12(6): 568-74.

14. Carr DB, Reppert SM, Bullen B, Skrinar G, Beitins I, Arnold M, et al. Plasma melatonin increases during exercise in women. J Clin Endocrinol Metab. 1981; 53(1): 224-5.

15. Cutler RG, Plummer J, Chowdhury K, Heward C. Oxidative stres profiling: Part II. theory, technolog, and practice. Ann N Y Acad Sci. 2005; 1055: 136-58.

16. Deaton CM, Marlin DJ. Exercise-associated oxidative stress. Clin Tech Equine Prac. 2003; 2(3): 278-91.

17. Dundar K, Topal T, Ay H, Oter S, Korkmaz A. Protective effects of exogenously administered or endogenously produced melatonin on hyperbaric oxygen-induced oxidative stress in the rat brain. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2005; 32(11): 926-30.

18. Elias AN, Wilson AF, Pandian MR, Rojas EJ, Kayaleh R, Stone SC, James N. Melatonin and gonadotropin secretion after acute exercise in physically active males. Eur J Appl Physiol. 1993; 66(4): 357-61.

19. Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, et al. Effects of melatonin treatment in septic newborns. Pediatr Res. 2001; 50: 756-60.

20. Greathouse KL, Samuels M, DiMarco NM, Criswell DS. Effects of increased dietary fat and exercise on skeletal muscle lipid peroxidation and antioxidant capacity in male rats. Eur J Nutr. 2005; 44(7): 429-35.

21. Hagerman FC. Energy metabolism and fuel utilization. Med Sci Sports Exerc. 1992; 24: 309-14.

22. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press New York USA. 2000; 107-208.

23. Hamada T, Ootomi M, Horikawa K, Niki T, Wakamatu H, Ishida N. The expression of the melatonin synthesis enzyme: Arylalkylamine N-Acetytransferases in the suprachiasmatic nucleus of rat brain. Biochem and Biophys Res Commun. 1999; 258: 772-7.

24. Hammouda A el-R, Khalil MM, Salem A. Lipid peroxidation products in pleural fluid for seperation of transudates and exudates. Clin Chem. 1995; 41: 1314-5.

25. Hara M, Mitsushi A, Suzuki T, Reiter RJ. Tissue changes in glutathione metabolism and lipid peroxidation induced by swimming are partially prevented by melatonin. Pharmacol Toxicol. 1996; 78: 308-12.

26. Hara M, Ligo M, Othani-Kaneko R, Nakamura N, Suuki T, Reither RJ, Hirata K. Administration of melatonin and related indoles prevents exercise-induced cellular oxidative changes in rats. Biol Signals. 1997; 6 (2): 90-100.

27. Hara M, Yoshida M, Nishijima H, et al. Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. J Pineal Res. 2001; 30: 129-38.

28. Humbert W, Pevet P. The decrease of pineal melatonin production with age. Causes and consequences. Ann N Y Acad Sci. 1994; 31; 719: 43-63.

29. Ianas O, Olivescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative processes. Rom J Endocrinol. 1991; 29: 117-23.

30. Keleştimur H. İnsanda pineal bezin fonksiyonları. F.Ü.Sağlık Bil Derg. 1996; 10(1): 141-7.

31. Klepac N, Rudes Z, Klepac R. Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes. Biomed Pharmacother. 2006; 60(1): 32-5.

32. Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, Menendez-Pelaez A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. J Pineal Res. 1998; 24: 83-9.

33. Kvetnoy I, Sandvik AK, Waldum HL. The diffuse neuroendocrine system and extrapineal melatonin. J Mol Endocrinology. 1997; 18: 1-3.

34. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidant in exercise. Curr Med Chem. 2001; 8(7): 829-38.

35. Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW, Brooks GA, Ames BN. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants.J Appl Physiol 2000; 89(1): 21-8.

36. Manev H, Uz T, Kharlamov A, Joo YY. Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin-deficient rats. FASEB. 1996; 10(13): 1546-51.

37. Mazepa RC, Cuevas MJ, Collado PS, Gonzales-Gallego J. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. Life Sci. 2000; 66: 153-60.

38. Mero AA, Vahalummukka M, Hulmi JJ, Kallio P, von Wright A. Effects of resistance exercise session after oral ingestion of melatonin on physiological and performance responses of adult men. Eur J Appl Physiol. 2006; 96(6): 729-39.

39. Miyazaki T, Hashimoto S, Masubuchi S, et al. Phase-advance shifts of human circadian pacemaker are accelerated by day time physical exercise. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001; 281: 197-205.

40. Monteleone P, Maj M, Fusco M, Orazzo C, Kemali D. Physical exercise at night blunts the nocturnal increase of plasma melatonin levels in healthy humans. Life Sci. 1990; 47(22): 1989-95.

41. Oztasan N, Taysi S, Gumustekin K, Altinkaynak K, Aktas O, Timur H,et al. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. Eur J Appl Physiol. 2004; 91(5-6): 622-7.

42. Pahkla R, Zilmer M, Kullisaar T, Rago L. Comparison of the antioxidant activity of melatonin and inoline in vitro. J Pineal Res. 1998; 24: 96-101.

43. Prajda N, Weber G. Malignant transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas. FEBS Lett. 1975; 59: 245-9.

44. Quindry JC, Stone WL, King J. Broeder CE. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. Med Sci Sports Exerc. 2003; 35(7): 1139-45.

45. Radak Z, Nakamura A, Nakamoto H, Asano K, Ohno H, Goto S. A period of anaerobic exercise increases the accumulation of reactive carbonyl derivatives in the lungs of rats. Pflugers Arch. 1998; 435(3): 439-41.

46. Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals. Brazilian J Med Biol Res. 1993; 26: 1141-55.

47. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Muñoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. Life Sci. 1997; 60(25): 2255-71.

48. Sack RL, Lewy AJ, Hughes RJ. Use of melatonin for sleep and circadian rhythm disorders. An Med. 1998; 30(1): 115-21.

49. Sener G, Paskaloglu K, Toklu H, Kapucu C, Ayanoglu-Dulger G, Kacmaz A, et al. Melatonin ameliorates chronic renal failure-induced oxidative organ damage in rats. J Pineal Res. 2004; 36(4): 232-41.

50. Somani SM, Frank S, Rybak LP. Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. Pharmacol Biochem Behav. 1995; 51(4): 627-34.

51. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem.1988; 34: 497-500.

52. Tan D-X, Chen L-D, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. Endocr J 1993; 1: 57-60.

53. Theron JJ, Oosthuizen JM, Rautenbach MM. Effect of physical exercise on plasma melatonin levels in normal volunteers. S Afr Med J. 1984; 66(22): 838-41.

54. Thomas L, Drew JE, Abramovich DR, Williams LM. The role of melatonin in the human fetus. Int J Mol Med. 1998; 1: 539-43.

55. Turgut M, Baka M, Yurtseven M. Pineal gland'dan salgılanan bir nörohormon olan melatoninin etkileri. Arşiv. 2002; 11: 453-70.

56. Umegaki K, Daohua P, Sugisawa A, Kimura M, Higuchi M. Influence of one bout of vigorous exercise on ascorbic asid in plasma and oxidative damage to DNA in blood cells and muscle in untrained rats. J Nutr Biochem. 2000; 11(7-8): 401-7.

57. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. Toxicology. 2003; 189(1-2): 41-54.

58. Van Cauter E, Sturis J, Byrne MM, Blackman JD, Scherberg NH, Leproult R, et al. Preliminary studies on the immediate phase-shifting effects of ligh and exercise on the human circadian clock. J Biol Rhythms. 1993; 8: 99-108.

59. Vani M, Reddy GP, Reddy GR, Thyagaraju K, Reddanna P. Glutathione-S-transferase, superoxide dismutase, xanthine oxidase, catalase, glutathione peroxidase and lipid peroxidation in the liver of exercised rats. Biochem Int. 1990; 21(1): 17-26.

60. Walberg-Rankin J. Dietary carbohydrate as an ergogenic aid for prolonged and brief competitions in sport. Int J Sport Nutr. 1995; 5: 13-28.

61. Wakatsuki A, Okatani Y, Shinohara K, Ikenoue N, Kaneda C, Fukaya T. Melatonin protects fetal rat brain against oxidative mitochondrial damage. J Pineal Res. 2001; 30(1): 22-8.

62. Yaga K, Tan DX,Reiter RJ, Manchester LC, Hattori A. Unusual reponses of noctural pineal melatonin synthesis and secretion to swimming: attempts to define mechanisms. J Pineal Res. 1993; 14(2): 98-103.

63. Yazıcı C, Köse K. Melatonin: the antioxidant power of darkness. E.U.Journal of Health Sci. 2004; 13(2): 56-65.

9. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Aydın'ın Nazilli ilçesinde doğdu. 1996 yılında liseyi bitirdi. 1996 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Biyoloji Bölümünü kazanarak 2000 yılında mezun oldu. Şu anda 2000 yılında başlamış olduğu biyoloji öğretmenliği görevini sürdürmekte ve aynı zamanda Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans eğitimine devam etmektedir.