ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARBONTETRAKLORÜR (CCl_4) UYGULANMIŞ SIÇANLARIN GASTROCNEMİUS KASINA MELATONİNİN ETKİSİ

Duygu Fevziye VURAL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2015

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

14.08. 2015

Duygu Fevziye VURAL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARBONTETRAKLORÜR (CCl_4) UYGULANMIŞ SIÇANLARIN GASTROCNEMİUS KASINA MELATONİNİN ETKİSİ

Duygu Fevziye VURAL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Suna CEBESOY

Bu çalışmada CCl_4'ün gastrocnemius kasına toksik etkisine karşı melatoninin (MEL) koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, 180-220gr ağırlığında 24 adet Wistar-Albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, kontrol grupları (Grup1, Grup2), CCl_4 (Grup 3) ve CCl_4 + MEL (Grup 4) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Fibrozis CCl_4'ün subkutan olarak verilmesiyle oluşturuldu. 10 haftalık sürenin sonunda intrakardiyak kan alınarak, kas dokuları çıkarıldı. Dokular ışık mikroskobu için rutin preparasyon işlemlerinden geçirildi. 5-6 μm kalınlığında kesitler alındı. Dokular, histopatolojik inceleme için hematoksilen-eosin (HE) ile fibrosiz oluşumu için Masson-Trikrom ile glikojen için ise Periyodik Asit- Schiff ile boyandı. Hematoksilen-eosin ile boyandığında kontrol grupları (Grup1,2) kas liflerinin organizasyonunun düzgün olduğu, CCl_4 verilmiş grupta (Grup 3) kas liflerinde yer yer erime, hipertrofi ve oryantasyon bozukluğu görüldü. İntraperitonal olarak verilen melatonin uygulanmış grupta ise (Grup 4) kaslar kontrol grubuna yakın olarak gözlemlendi. Masson trikrom ile boyandığında kontrol gruplarında kollajen lifler normal olarak gözlemlendi. CCl_4 uygulanmış grupta bağ dokuda ve kan damarı etrafında kollajen lif artışı gözlemlendi. Melatonin uygulanmış CCl_4 grubunda ise kollajen liflerde azalma gözlemlendi. PAS boyamada ise bütün gruplar PAS pozitif çıkmıştır.

Ağustos 2015, 53 sayfa

Anahtar Kelimeler: İskelet kası, melatonin, CCl_4, oksidatif stres, histokimyasal test

ABSTRACT

Master Thesis

THE EFFECT OF MELATONİNE ON RATS GASTROCNEMİUS MUSCLE, WHİCH ARE APPLİED CARBONTETRACHLORİDE (CCl_4)

Duygu Fevziye VURAL

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Dr. Suna CEBESOY

In this study, it is purposed that it is examined the protective effect of the melatonin (MEL) against the toxic effect on gastrocnemius muscle of the CCl_4. In this study, it was used 24 Wistar-Albino male rats which their weights are 180-220 gr. The rats were separated for four groups; control groups (Group 1, Group 2), CCl_4 (Group 3) and CCl_4 + MEL (Group 4). Fibrosis was composed via giving the CCl_4 as subcutaneous. At the end of the 10 weeks, it was removed the muscle tissues by drawing intracardiac blood. The tissues were processed routine preparation treatment for light microscope. It was taken sections that their thicknesses were 5-6 μm. The tissues were stained respectively with hematoxylin eosin (HE) for the histopathologic examination, Masson-Trikrom for the fibrosis formation, and Periodic Acid-Schiff for the glycogen. When the control groups (Group 1, 2) were stained with the Hematoxylin-eosin, it was seen that it was regular the organizations of the muscle tissues; and it was fusion in places, hypertrophy and orientation disorder in the muscle tissues in the group (Group 3) which the CCl_4 was given. It was observed that the muscles were near the control group in the group (Group 4) which was applied the melatonin by giving as intraperitoneal. When it was stained with the Masson-Trikrom, it was observed that the collagen tissues were normal in the control groups. In group which was applied the CCl_4, it was observed the increase of collagen tissue on the connective tissue and around the blood vessel. In the CCl_4 group which was applied the melatonin, it was observed the decrease of collagen tissues. At the same time, in the PAS staining all groups were PAS positive.

August 2015, 53 pages

Key Words: Skeletal muscle, melatonin, CCl_4, oxidative stress, histochemical test.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve inancından dolayı değerli danışmam hocam, yol göstericim Doç. Dr. Suna CEBESOY'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), engin tecrübelerinden faydalandığım sayın hocam Prof. Dr. Nesrin Özsoy'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), çalışmanın her aşamasında yanımda olan, ihtiyaç duyduğum anda her daim yardım eden, hiç çekinmeden laboratuarını ve evini açan değerli dostum Araş. Gör. Dr. Dilşad Özerkan'a, dokuların mikroskopta fotoğraf çekiminde yardımcı olan Araş. Gör. Aydan ACAR'a, çalışma arkadaşım Safa Mohammed Elmustafa Osman ELMUBARAK'a, her daim yanımda olan özellikle psikolojik desteği hiç kesmeyen sevgili hocam Araş. Gör. Dr. Hatice MUTLU EYİSON' a, arkadaşım Gülsel Aysu ASLAN'a ve bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme ve dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Duygu Fevziye VURAL
Ankara, Ağustos 2015

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK……..i

ÖZET…….....ii

ABSTRACT…….....iii

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR…….....iv

SİMGELER DİZİNİ……vii

ŞEKİLLER DİZİNİ……..…...viii

1. GİRİŞ……....1

2. Kuramsal temeller……...3

2.1 CCl_4'ün kimyasal yapısı ve kullanım alanları……3

2.1.1 CCl_4'ün biyolojik etkileri……...6

2.2. Melatonin……...6

2.2.1 Melatoninin (N-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]) keşfi……6

2.2.2 Epifiz (pineal) bezi……..7

2.2.3 Melatonin sentezi……8

2.2.4 Melatoninin kromozomda lokalize olduğu yerler ve etki mekanizması……..10

2.2.5 Melatonin sentezinin nöral kontrolü……...12

2.2.6 Melatoninin fizyolojik etkileri……12

2.2.7 Işık ile melatonin salınımında ki değişiklik……14

2.2.8 Melatoninin yaşa bağlı değişimi……..14

2.2.9 Melatoninin immünolojik etkisi……..14

2.2.10 Melatoninin antioksidan etkisi……..15

2.2.11 Melatoninin anti-apoptotik etkileri……..15

2.3. Gastrocnemius Kası ve Anatamosi……...16

2.4. İskelet kası fibrozisi……17

3. MATERYAL ve YÖNTEM……..18

3.1 Deney Hayvanları……18

3.2 Uygulanan Yöntemler……18

3.2.1 Araştırma planı……18

3.3.2 Histokimyasal inceleme……19

3.3.3 Masson trikrom boyama yöntemi……...20

3.3.4 Periyodik asit schiff (PAS) boyama……21

4. ARAŞTIRMA BULGULARI……...22

4.1 Histokimyasal Sonuçlar ……..22

4.1.1 Hematoksilen-Eosin (H&E)……22

4.1.2 Masson-Trikrom……...27

4.1.3 Periyodik Asit-Schiff (PAS)……34

5. TARTIŞMA ve SONUÇ……39

KAYNAKLAR…….……37

ÖZGEÇMİŞ……...53

SİMGELER DİZİNİ

CCL_4	Karbon tetraklorür
CCl_3	Triklorometil
$CCl_3/\cdot CCl_3O_2$	Triklorometil peroksit
ml	Mililitre
mg	Miligram
gr	Gram
º C	Santigrat

Kısaltmalar

PBS	Fosfat Tamponu
min	minimum

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 CCl_4' ün metabolizma ürünleri……...5
Şekil 2.2 Pineal bez ve yeri……...……8
Şekil 2.3Melatoninin kimyasal yapısı…….....9
Şekil 2.4 Karanlık/ aydınlık uyarı ile melatonin sentezinin düzenlenmesi……10
Şekil 2.5 Pineal bezde melatonin sentezinin kontrolu……12
Şekil 2.6 Melatoninin ritm düzenleyici rolü……...…….13
Şekil 2.7 Melatoninin immün sisteme etkileri……...…..15
Şekil 2.8 Gastocnemius kasının lateralden görüntüsü…….....17
Şekil 4.1 Kontrol grubu……...…22
Şekil 4.2 Kontrol grubu (PBS+ etanol) sıçan gastrocnemius kasının histolojik yapısı…….23
Şekil 4.3 Kontrol grubu (mısır yağı) sıçan gastrocnemius kasında damarın yapısı…….23
Şekil 4.4 CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kas liflerinde erime, perivasküler bağ doku artışı, vakuoler dejenerasyon ve hipertrofi……...…24
Şekil 4.5 CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kasında hipertrofi ve fibrillerde erime……24
Şekil 4.6 CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kas hücrelerinde hipertofi…….....25
Şekil 4.7 CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kas fibrillerinde erime ve fibrozis…..25
Şekil 4.8 CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kas hücrelerinde erime ve morfolojik karakterde bozulma……....26
Şekil 4.9 CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kas fibrillerinde kontraktil protein kaybı ve oryantasyon bozukluğu……...…26
Şekil 4.10 Melatonin uygulanmış CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kas hücreleri normale yakın bir görünüm izlemekte……27
Şekil 4.11 Kontrol grubu (mısır yağı) sıçan gastrocnemius kasında bağ doku……...28
Şekil 4.12 Kontrol grubu (PBS+ etanol) sıçan gastrocnemius kasında bağ doku…...…28
Şekil 4.13 Kontrol grubu (mısır yağı) sıçan gastrocnemius kasında damarın yapısı…..29
Şekil 4.14 CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında kan damarları etrafında kollajen lif artışı ve kas fibrillerinde erime ve anjiyogenezis……....29

Şekil 4.15 CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında sinir pleksusları etrafında fibrozis ve oryantasyon bozukluğu……30
Şekil 4.16 CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında sinir pleksusları etrafında kollajen lifte ve periovasküler bağ doku da artış ve anjiyogenezis……...30
Şekil 4.17 CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında sinir pleksusları etrafında fibrozis, oryantasyon bozukluğu ve fibrillerde erime……...….31
Şekil 4.18 CCl_4+melatonin grubunda ait gastrocnemius kası…….31
Şekil 4.19 Melatonin uygulanmış CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında kollejen lifte azalma ve normale yakın doku görünümü……...32
Şekil 4.20 Melatonin uygulanmış CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında kan damarı etrafında kollajen lif artışı…….32
Şekil 4.21 Melatonin uygulanmış CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında periovasküler bağ dokusu artışı……..33
Şekil 4.22 Melatonin uygulanmış CCl_4 grubu sıçan gastrocnemiusunda hipertrofi…....33
Şekil 4.23 Kontrol grubu (mısır yağı) sıçan gastrocnemius kası PAS pozitif…….34
Şekil 4.24 Kontrol grubu (PBS+ etanol) sıçan gastrocnemius kası PAS pozitif…….....34
Şekil 4.25 CCl_4 uygulanmış sıçan gastrocnemiusu PAS pozitif ve kas fibrillerinde erime…….....35
Şekil 4.26 CCl_4 uygulanmış sıçan gastrocnemius kası……....35
Şekil 4.27 Melatonin uygulanmış CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında kollajen lifte azalma ve fibrillerde normale yakın görünüm……...…..36
Şekil 4.28 CCl_4+melatonin grubuna ait gastrocnemius kası……...…36
Şekil 4.29 CCl_4+melatonin grubuna ait gastrocnemius kasında kısmen düzelme, normale yakın görünüm…….....37
Şekil 4.30 CCl_4+melatonin grubuna ait gastrocnemius kasında kollejen lifte azalma, normale yakın görünüm……...…..37
Şekil 4.31 CCl_4+melatonin grubuna ait gastrocnemius kasında kollejende lifte azalma, normale yakın görünüm……..…38

1. GİRİŞ

Karbon tetraklorür (CCl_4) renksiz, yanıcı olmayan, çabuk buharlaşan, hoş kokulu yoğun bir sıvı olup, doğal olarak bulunmamaktadır. CCl_4 vücuda soluma, yutma ve deri yolu ile alınır, akciğerler yoluyla alınan CCl_4 miktarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Pope ve Rall 1995).

CCl_4 biyolojik olarak aktif değildir, aktivasyonları için reaktif toksik metabolitlere çevrilmeleri gerekir, bundan sonra hedef hücrelerde rol alırlar (Murray vd. 1993, Akkuş 1995, Kayaalp 2002). CCl_4 karaciğerde olduğu kadar böbrek, testis, kalp, akciğer, beyin ve kan gibi diğer dokularda da toksik etkisinin olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Tirkey vd. 2005, Ogeturk vd. 2005) .

CCl_4'ün toksik etkisi onun serbest radikali olan triklorometil'e (CCl_3) dönüşümü sonrasında görülür (Ahmed vd. 2000, Arasıo vd. 2000, Murali vd. 2004). Bu etkiler CCl_4'ün sitokrom P450 (CYP) enzimiyle daha toksik olan triklorometil ve triklorometil peroksit (CCl_3/$\cdot CCl_3O_2$) veya *N*-asetil-*p*-benzokinonelmin (NAPQI) serbest radikallerine dönüşmesi sonucu meydana gelmektedir (Ogeturk vd. 2005).

Serbest radikallerin vücutta oluşturdukları hasarın en aza indirilmesinde antioksidanların etkisi oldukça fazladır (Valko vd. 2006). Pineal bezin hormonu olan melatonin (Lerner vd. 1958) güçlü bir antioksidant olup süperoksit radikalleri, diğer radikal oksijen türevlerini (ROS) ve radikal nitrojen türevlerini süpürür. Melatonin ayrıca dolaylı yoldan antioksidant enzim genlerinin ekspresyonunu destekler ve prooksidant gen ekspresyonunu ise inhibe eder (Reiter vd. 2009). Melatonin aynı zamanda dolaylı olarak süperoksit dismutaz (SOD), CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivasyonuna etki eder (Barlow-Walden vd. 1995, Antolin vd. 1996, Pablos vd. 1998) . Bu aktivasyon antioksidan enzimlerin mRNA sentezinin sonucunda ve nihayet enzimin uyarılmasıyla gerçekleşir (Pablosvd. 1998, Mayo vd. 2002, Coto-Montes vd. 2003).

Melatonin yüksek düzeyde amfofilik özelliğe sahiptir, vücutta depolanmadan hızla kan ve vücut sıvılarına karışır (Brezezinski 1997, Reiter 1991). Bu özelliğinden dolayı nükleus dahil hücrenin her organeline ulaşabilir ve bu sebeple de vitamin ve mineral antioksidanlara göre çok daha etkilidir (Reiter vd. 2000) sonuç olarak oksidatif hasara karşı DNA ve hücrelerin korunmasında melatonine üstünlük sağlar (Guerrero ve Reiter 1992, Arendt 1988, Kuş ve Sarsılmaz 2002).

CCl_4 ve melatoninle yapılan bu araştırmalar daha çok karaciğer, böbrek ve akciğer kullanılmıştır. Kas dokusunda CCl_4 ve melatonin ile ilgili araştırmalara histolojik olarak rastlanmamıştır.

Bu çalışmada hem CCl_4'ün gastrocnemius kasına olumsuz etkisi hem de melatoninin iyileştirici ve koruyucu etkisi araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 CCl_4'ün kimyasal yapısı ve kullanım alanları

CCl_4 (karbontetraklorür)renksiz, yanıcı olmayan, çabuk buharlaşan, hoş kokulu yoğun bir sıvıdır. CCl_4 doğal olarak bulunmasına rağmen kimyasal olarak üretilmektedir. CCl_4 kararlı yapısı nedeni ile çok yavaş bozunur, tahmini atmosferik yarı ömrü 30-100 yıldır (Pope ve Rall 1995).

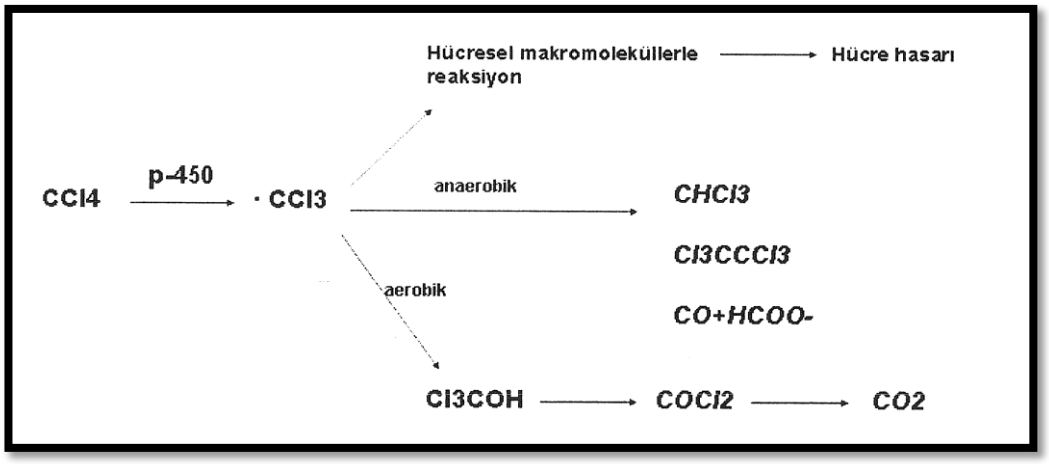
CCl_4 ve diğer sıvı halojenli hidrokarbonlar geçmiş yıllardan bu yana kuru temizlemenin yanı sıra, boya ve çözücülerde, yangın söndürücülerde ayrıca yağ uzaklaştırıcı maddeler (deterjan) olarak kullanılır (Maianskii ve Kutina 1979, Çınar vd. 1999) . Veteriner hekimlikte ise helmintlere karşı paraziter mücadelede uygulanmaktadır (Adams, 1995, Kaneko vd. 2000). Vücuda solunum, sindirim ve deri yoluyla alınabilen karbon tetraklorür (CCl_4) başta karaciğer olmak üzere beyin, böbrek, kas, akciğer ve testis gibi dokulara dağılır (Abraham vd.1999, Tirkey vd. 2005). Akciğer yoluyla alınan CCl_4 sindirim ve deri yoluyla alınan miktarla karşılaştırıldığında daha fazladır. İnsanlarda CCl4'ün yaklaşık %50-80'i akciğerler tarafından absorbe edilir. Metabolize olmuş CCl_4'ün yaklaşık %4'ü direkt olarak CO_2'e dönüştürülür ve nefesle dışarı verilir (Pope ve Rall, 1995). CCl_4' e maruz kalabilecek çalışanlar şöyle sıralanabilir;

1. Hava taşımacılığı çalışanları
2. Otomobil tamircileri
3. Kuru temizleyicileri
4. Hububat çalışanları
5. Tehlikeli atık çalışanları
6. Müze çalışanları
7. Böcek ilacı uygulayıcılar
8. Farmasötikal üreticiler
9. Telefon ve telgraf ekipman üreticileri
10. Teneke atığı değerlendirme işlerinde çalışanlar
11. Kimya fabrikalarına yakın bölgelerde yaşayan insanlar (Pope ve Rall 1995).

Bunların dışında, genel populasyon çevredeki havadan küçük miktarlarda da olsa CCl_4'e maruz kalabilir çünkü CCl_4 kolay buharlaşır ayrıca CCl_4'in kimyasal atık olarak havaya, suya ve toprağa geçişi kontrol edilememektedir (Pope ve Rall 1995).

Karbontetraklorür karaciğerde olduğu kadar böbrek, testis, kalp, akciğer, beyin ve kan gibi diğer dokularda da toksik etkisinin olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Tirkey vd. 2005, Ögetürk vd. 2005). Bu etkisinin serbest oksijen radikallerine bağlı olduğu gösterilmiştir (Ögetürk vd. 2005). CCl_4 serbest radikal üretimi ile hücresel hasar oluşturabilen, insan ve hayvan için hepatoksisiteye neden olabilen ksenobiyotiktir (Leon vd. 1998, Mansour 2000, Kuş vd. 2004, Taniguchi vd. 2004). Ksenobiyotikler vücuda yabancı olan, birçok kimyasal madde ve ilacın toksik etkisi, onların serbest radikale dönüşümleri veya oksijen kaynaklı metabolitleri oluşturmaları sonucu ortaya çıkar. CCl_4 biyolojik olarak aktif değildir aktivasyonları için reaktif toksik metabolitlere çevrilmeleri gerekir. Ancak bundan sonra hedef hücrelerde rol oynarlar (Murray vd.1993, Akkuş 1995, Kayaalp 2002). Deney hayvanları ile yapılan çalışmaların işaret ettiğine göre, CCl_4'ün toksik etkisi onun serbest radikalı olan triklorometil'e (CCl_3) dönüşümü sonrasında görülür (Ahmed vd. 2000, Muralı vd. 2004).

CCl_4 doku ve organlarda akut ve kronik zedelenmeye yol açar (Tirkey vd. 2005, Ogetürk vd. 2005). Karaciğer hasarı; membran lipid peroksidasyonu ve hücre yaralanması ile ilişkilidir (Balsam vd. 2004). Bu etkinin ise serbest oksijen radikallere bağlı olduğu ortaya çıkarılmıştır. CCl4, lipid peroksidasyon ürünlerinin artışına ve bu ürünlere karşı koruyucu olan enzimlerin azalmasına neden olmaktadır. Bu etkiler CCl4'ün sitokrom P450 (CYP) enzimiyle daha toksik olan triklorometil ve triklorometil peroksit (CCl_3/$\cdot CCl_3O_2$) veya N-asetil-p-benzokinonelmin (NAPQI) serbest radikallerine dönüşmesi sonucu meydana gelmektedir (Ogetürk 2005) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 CCl_4' ün metabolizma ürünleri (Pope ve Rall 1995)

Karbon tetraklorürün toksik etkilerinden karaciğerde biyotransformasyonu sonucu oluşan triklorometil (CCl_3) radikali sorumludur. Karbon tetraklorürün CCl_3'e dönüştürülmesi sitokrom P-450 tarafından gerçekleştirilir. Sitokrom P-450; granülsüz endolazmik retikulumda yer alan, monooksijenaz gibi her biri belirli bir substrat için özel olan kolesterol, yağ asitleri, steroid biyosentezi ve detoksifikasyon için gereken hidroksilasyon mekanizmasını gerçekleştiren birçok enzimin yer aldığı bir elektron taşıma sistemidir. Sitokrom P-450 diğer organlara göre en çok karaciğerde bulunur. Sitokrom P-450 tarafından gerçekleştirilen hidroksilasyon mekanizması yabancı maddeleri ara metabolitler haline dönüştürerek vücuttan uzaklaştırılmasını sağlayan bir reaksiyondur (Sheweita vd. 2001, Güneş 2003). Bu radikal daha sonra oksijen ile birleşerek triklormetil peroksil (CCl_3O_2) radikalini oluşturur. Bu serbest radikal metabolitleri poliansantüre yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peraksidasyonunu başlatır ya da kovalent olarak yağlara ve proteinlere bağlanarak hücre zarının bozulmasına yol açar (Mansour, 2000, Kuş vd.2004). Peroksil radikali, hücrenin zar yapısını bozarak hasarın oluşmasında birincil mekanizma olarak rol oynayan güçlü bir lipid peroksidasyon başlatıcısıdır (Srinivasan vd. 2005). Bu durum ise özellikle karaciğer üzerinde hasar oluşturduğu bilinen karbon tetraklorürün yapılan deneysel çalışmalarda beyin, kalp ve böbrek gibi organlarda da oksidatif hasar oluşturduğu gösterilmiştir (Szymonik-Lesiuk vd.2003, Karadeniz vd. 2007 ve 2009).

2.1.1 CCl_4'ün biyolojik etkileri

CCl_4'e herhangi bir şekilde maruz kalındığında hastalarda baskın bir şekilde merkezi sinir sistemi baskılanması görülür. Doza bağlı olarak görülen yaygın semptomlar ise; baş dönmesi, baş ağrısı, güçsüzlük, vücut hareketlerinde düzensizlik, uyuşukluk, sersemlik ve komadır. Şiddeti daha az olan vakalarda etkiler, CCl_4 kesilmesinden bir veya 2 gün sonra ortadan kalkar. Gastrointestinal olarak görülen semptomlardan mide bulantısı, karın ağrısı, kusma ve ishal akut maruz kalmadan sonra otonomik sinir sistemi üzerine olan başlangıç etkiler olarak görülür. Kronik ve akut maruz kalma durumlarında semptomlar benzerdir (Pope ve Rall 1995). Ancak akut maruz kalma hepatoksisiteye neden olurken kronik olarak maruz kalma siroza neden olabilir (Basu, 2003). Oral ve solunum yoluyla CCl_4'e maruz kalan yeni doğan sıçanlarda yeni doğanlarda azalan hayatta kalma şansı ile sıçanlarda azalan fertilite sperm üretiminin erkek sıçanlarda azalması ve testislerde dejeneratif değişiklikler gözlemlenmiştir (Muralı vd. 2004). Yapılan bazı çalışmalar CCl_4'ün hepatotoksisiteye neden olduğu ve serbest radikal üretimini özellikle lipid peroksidasyon seviyelerini artırdığı bildirilmiştir (Kuş vd. 2004, Yamomoto vd. 2000, Muriel vd. 2001). Yapılan başka bir çalışma da CCl_4'e maruz kalan hepatositlerde lipid peroksidasyon malondialdehid (MDA) düzeyinin ölçülmesi ile belirlenmiş ve MDA düzeyinin synandione ve CCl_4'in birlikte verildiği grupta, CCl_4'in tek başına verildiği gruptan önemli düzeyde düşük bulunduğu tespit edilmiştir (Lee vd. 2000).

2.2 Melatonin

2.2.1 Melatoninin (N-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]) keşfi

Melatoninin pineal bezden (epifiz bezi) ilk olarak keşfi Lerner ve arkadaşları tarafından 1958'de gerçekleşmiştir (Lerner vd.1958). Melatoninin bu dönemde tanımı "*melanophorecontracting hormon*" olarak yapılmış ve gerek kurbağa derisindeki **mela**noforların beyaz görünüşüneneden olduğu için ve gerekse sero**tonin**dentürediği için bu isim verilmiştir (Hardeland 2006). Melatonin, memelilerin başlıca beyninde serebral yarıküreler arasındaki pineal bezden ve ayrıca over, lens ve kemik iliği

hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur (Reiter vd.1995).

Retinada sentezlenen melatonin retinal pigment epitel fonksiyonunun ve fotoreseptorlerdeki gece-gündüz varyasyonuna karşı retinanın vereceği yanıtın düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Deride; pigment granüllerin değişiminden ve derin dokuların güneşin zararlı radyasyonuna karşı korunmasından sorumlu olan melatonin, gastrointestinal kanalda enterokromafin hücrelerde sentezlenmekte ve post-prandiyal olarak dolaşıma salıverilmektedir.

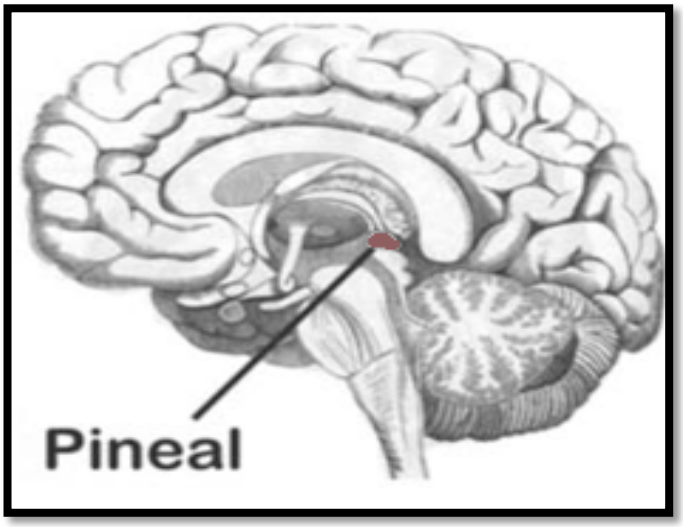
Nitekim melatoninin post-prandiyal plazma düzeyindeki artışlar öğün sonrası hipnotik etkisiyle ilişkisini doğrulamaktadır. Safrada sentezlenen melatonin ise okside kolesterol türevlerine ve safra asitine karşı safra yollarının mukozasını ve epitelini oksitdatif hasara karşı korumaktadır (Konturek vd. 2007).

Ayrıca melatonin bazı bitkilerin köklerinde, yapraklarında, meyve tohumlarında da saptanmıştır. Bunlar; badem, karalahana ve beyaz hardal tohumu, elma, domates ve vişnedir (Korkmaz vd. 2011).

2.2.2 Pineal (epifiz) bezi

Pineal bez küçük, tek bir beyin uzantısıdır. Pineal bez, posterior komissür ve dorsal habenular komissür arasında, üçüncü ventrikülün posterior duvarına yapışıktır. Boyutu ve pozisyonu türler içinde dahi faklılık gösterir (Şekil 2.2). Pineal bez memelilerde sekretuar, balıklarda ve amfibienlerde fotoreseptif, sürüngenlerde ve kuşlarda ise hem fotoreseptif hem de sekretuar fonksiyonları üstlenmiş bir organdır. Temel hücresi pinealosittir (Arendt 1995). Pinealosit hem paranöron hem de APUD (amin prekürsörlerini alan ve dekarboksile eden) hücre serisine ait özellikler taşır. Pinealositler yoğun çekirdeklidirler; granüler ve agranüler veziküller içeren aktif sekretuar oluşumlara sahiptirler. Salgıladıkları esas hormon melatonin (5-metoksi- N-asetiltriptamin)'dir (Arendt 1995). Diffuz nöroendokrin sistem içinde kabul edilen

APUD (amine precursor uptake and decarboxilation) hücrelerinde melatonin sentez edildiği gösterilmiştir. Bu hücreler retina, lakrimal bezler, beynin diğer bölgeleri ile bronş, karaciğer, böbrek, adrenal bezler, gastrointestinal sistem, timus, plasenta, over, testis ve endometriumda yer alır. Ayrıca mast hücresi, lökosit ve doğal öldürücü hücrelerde melatonin sentezlenmektedir (Altun vd.2001). Bez pinealositler ve nöroglialardan oluşur. Pinealositler norepinefrin, histamin, serotonin, melatonin, dopamin gibi biyolojik aminleri ve LHRH, TRH, somatostatin, arginin, vasopressin gibi peptidleri sentez ederler (Brzezinski, 1997). Pineal bez böbreklerden sonra damarsal yapıdan (kan akımı 4ml/dk/gr) en zengin organdır. Bezin uyarımında sempatik sistem baskındır ve superior sempatik gangliondan kaynaklanan sinir lifleri internal karotid sinir ile beze ulaşır.



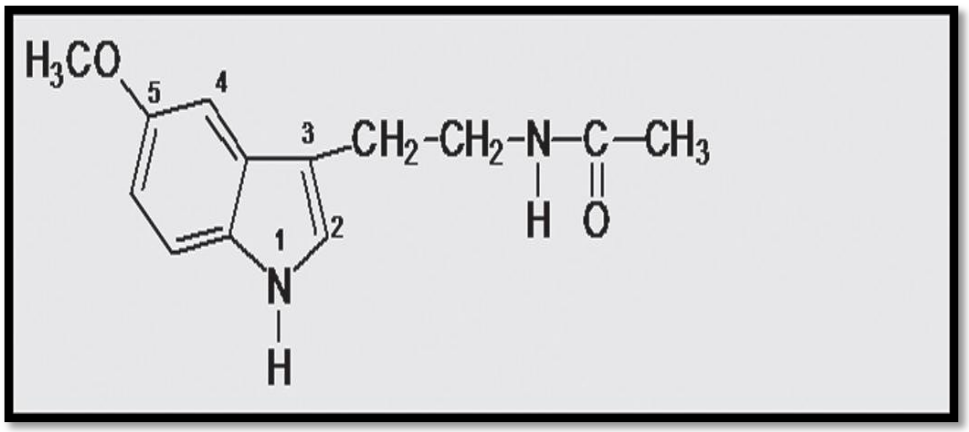
Şekil 2.2 Pineal bez ve yeri (http://www.fluoridealert.org/wpcontent/pesticides/sodium.f.pineal.htm)

2.2.3 Melatonin sentezi

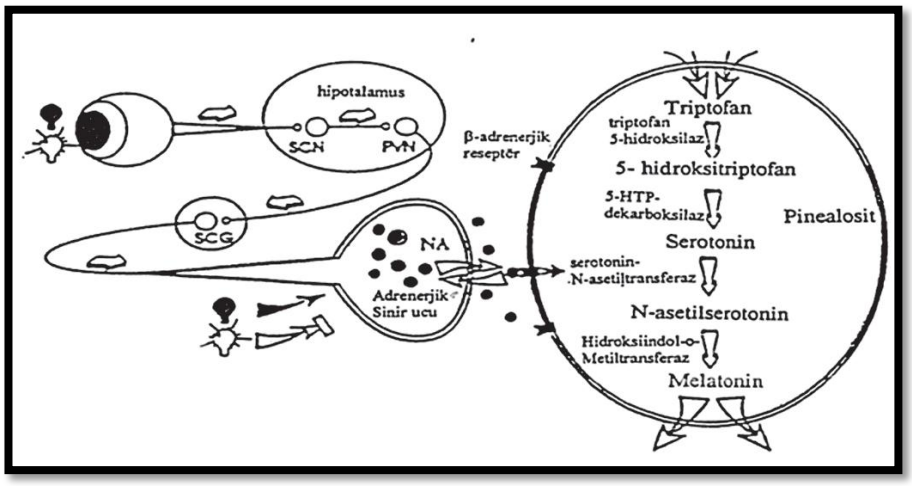
Melatonin bir indolamindir ve pinealositlerde sentez edilir (Altun vd.2001). Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin, Şekil 2.3) sentezinde birinci basamak triptofanın pinealositler içine alınması ve orada pineal bir enzim olan N-asetiltransferaz (NAT) tarafından N-asetil serotonine dönüştürülmesidir. N-asetil serotoninin melatonine dönüşümü diğer bir pineal enzim olan hidroksiindol-o-metiltransferaz (HIOMT) aracılığı ile olur (Reiter vd.1997).

Sentezden sorumlu N-asetiltransferaz'ın aktivitesi dolayısıyla melatonin sentezi spesifik c-AMP-bağımlı transkripsiyon faktörleri ve fotoperiyodik şartlar tarafından düzenlenir. Işık altında, retinadan başlayan nöronal impulslar, hipotalamusta suprachiasmatic nukleus (SCN) ve diğer hipotalamik yapılara aktarılır. Uyarı SCN ve periventriküler nukleus (PVN) aracılığı ile superior servikal gangliyona geçer. İnsanda karanlığın başlaması ile postganglionik sempatik liflerden salıverilen noradrenalin esas olarak β1 reseptörlere bağlanarak, depolardaki serotonin ve NAT'nin intrasellüler salıverilmesine neden olur. Nöronlarda ve pineal bezdeki biyokimyasal sinyallerin bu döngüsü insanda melatonin anabolizmasını hızlandırır ve aynı zamanda melatoninin gün içi ritme bağlı olarak sentez ve salıverilmesini oluşturur (Reiter 1991) (Şekil 2.4). Salgılanan melatonini hücre içine aktaran moleküller heterotrimerik G proteinleridir. G proteinlerinin üç alt birimden (α, β ve γ) oluştuğu saptanmıştır. α-alt birimi guanin nükleotitleri bağlayan diğer proteinlerle yapısal ve işlevsel benzerlikler gösterir ve birincil yapısı G proteinini tanımlar (Helper 1992). β ve γ-alt birimleri birbirlerine sıkıca bağlıdırlar ve ancak çok güçlü denatürantlarla işlem görürlerse ayrılırlar (Raymond, 1994). Her G proteininde βγ kompleksi bulunmasına rağmen, G proteinleri α-alt birimlerine göre sınıflandırılırlar (Helper 1992).

Gece 20.00-23.00 arası yükselen melatonin düzeyi 01.00-05.00 arası doruk değerlere ulaşır ve gündüz düşer. Sağlıklı kişilerde plazma melatonin düzeyi gündüz 0-20 pg/ml, gece 20-200 pg/ml (ortalama 60-70 pg/ml) dir. Bir günde yaklaşık 30 mg (%80 i gece) melatonin üretilir.



Şekil 2.3 Melatoninin kimyasal yapısı (Şener 2010)



Şekil 2.4 Karanlık/ aydınlık uyarı ile melatonin sentezinin düzenlenmesi (Beyer1998)

2.2.4 Melatonin reseptörlerinin kromozomda lokalize olduğu yerler ve etki mekanizması

Melatoninin insandaki etkileri iki kategoride incelenebilir. Bunlardan ilki vücutta büyük oranda pineal bezden salgılanan melatoninin sirkadiyen ritmi düzenleyici etkisidir. İkincisi ise bu hormonun vücuttaki anabolik fizyolojik etkileridir (Altun vd. 2001). Melatonin suya göre lipid çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle hücrelere rahatça girebilmektedir. Bu nedenle etkileri sadece membrana yönelik değildir. Sulu ortamda kısmen çözünmesi de intrasellüler etkilerinin oluşmasına katkıda bulunur. Son çalışmalar melatoninin nükleusta yüksek konsantrasyonda bulunduğunu ve melatonin için spesifik bağlanma noktalarının olduğunu göstermiştir. Bu bulgulara göre melatonin etkilerinin tiroid ve steroid hormonlara benzer şekilde nukleustaki moleküler olaylarla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Penev ve Zee 1997). Melatonin agonisti 2-[I^{125}]iodomelatonin ile yapılan radyoreseptor tayinler ve invitro kantitatif otoradyografi çalışmalarında beyinde ve insan dahil olmak üzere bazı omurgalı türlerde periferik dokularda melatonin reseptörlerinin varlığı ve bu reseptörlerin G-proteinleri ile kenetli olduğu belirtilmiştir. Melatoninin ML1 ve ML2 olarak bilinen farklı farmakolojik familyalara ait membran bağımlı iki tip reseptörü tanımlanmıştır. Güçlü melatonin agonisti $2^{-[125I]}$iodomelatonin kullanılarak yapılan incelemelerde tavuk ve tavşan retinasında ML1 reseptörlerinin yüksek afiniteli (Kd~75pM) reseptörler olduğu, buna karşılık ML2 reseptörlerinin aynı melatonin agonistlerine düşük afinite gösterdiği

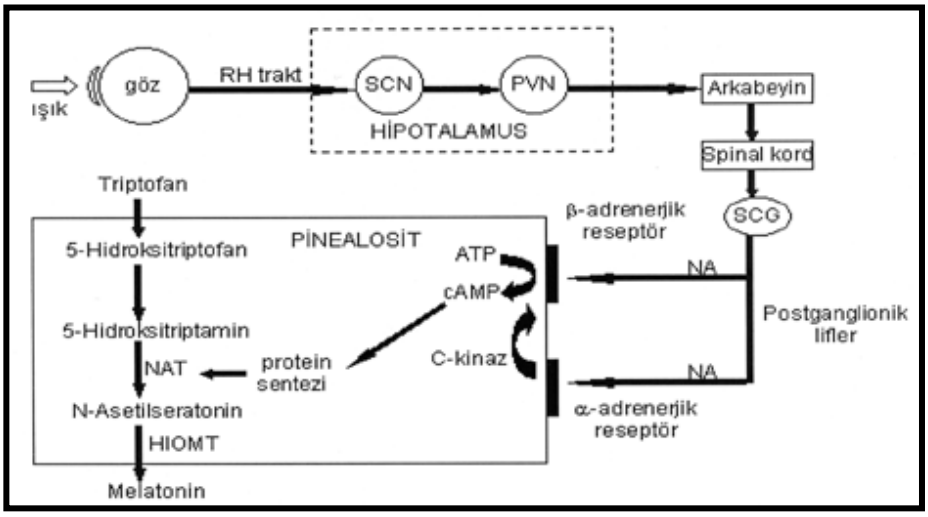
belirlenmiştir (Reiter 1991, Jahovic vd. 2003). ML1 reseptörlerinin 3 alt tipi vardır. Mel1a (Bu reseptörler MT1 reseptörleri olarak da isimlendirilmiştir; Kd; 20-40 pM), Mel1b (MT2 reseptörleri; Kd; 160 pM), Mel1c (MT3 reseptörleri; Kd; 20-60 pM) (Dubocovich vd. 1997). Mel-1a reseptör geni insan kromozomunda 4q35.1 lokalizasyonunda kodlanmıştır. Sirkadian ve reprodüktif etkilerinin bu reseptör aracılığı ile gerçekleştiği düşünülür. Mel-1b reseptör geni insan kromozomunda 11q21-22 bölgesinde kodlanmıştır. Mel-1c geni ise insanda saptanmamıştır (Sugden ve Chong 1991).

ML1 reseptörleri serebellum, hipokampus dâhil olmak üzere nöronal yerleşim göstermektedir. Ayrıca SCN, hipotalamus, talamus, preoptik alan, retinanın pleksiform tabakası ve serebral korteksin pek çok bölgesinde ML1 reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir (Reppert vd.1996). Nöronal olmayan ML1 reseptörleri, serebral ve caudal arterlerde, hipofizeal pars tuberaliste, ovaryum, böbrek ve ince barsaklarda bulunmuştur. ML2 reseptörlerinin memeli hücrelerinde spesifik dağılımı henüz iyi açıklanmamıştır (Reppert vd.1996). ML1 reseptörleri renal fonksiyon, uyku, sirkadiyen ritm, üreme ve serebral arter kontraktilitesinden sorumludur. Bu reseptörler memeli retinasında Ca^{+2}-bağımlı dopamin salıverilmesi ve retinal fotopigment disklerinin fagositozu gibi ışığa bağımlı olaylar da rol oynar. ML1 reseptör aktivasyonu (GI proteinleri aracılığı ile) adenilat siklaz inhibisyonu ile 3'5' c-AMP düzeyinde düşmeye neden olur. Ayrıca sadece ML1 reseptörlerinin, fosfolipaz aktivasyonu aracılığı ile araşidonat salıverilmesini stimüle ettiği gösterilmiştir (Song vd.1997).

Düşük afiniteli ML2 reseptörlerinin de G-proteinleri ile kenetli olduğu ve sinyal iletiminde ML1 reseptörlerine benzer davranışta bulunduğu ileri sürülmektedir. Ancak ML1'lerden farklı olarak ML2 reseptörlerinin aktivasyonunun fosfoinozitid (PI) hidrolizi ile kenetli olduğu ve selektif ML2 antagonisti uygulanımının bu hidrolizi geri çevirdiği belirtilmiştir (Dubovich 1995).

2.2.5 Melatonin sentezinin nöral kontrolü

Norepinefrin, melatonin sentezini alfa-1 stimülasyonun güçlendirdiği, beta-1 reseptör aracılığıyla sağlar. İkinci mesajcı olarak cAMP aracılığıyla N-asetil transferaz aktivitesini arttırır. Epifiz, retina ve suprakiazmatik nükleus (SKN) ışığın görme dışı etkilerinin algılanmasında ve değerlendirilmesinde temel yapılardır. Retinal fotoreseptörler, çevreden gelen ışığı retinohipotalamik trakt ile SKN'a taşınan elektriksel iletilere çevirirler. Bu monosinaptik retinal yol tüm büyük memelilerde gösterilmiştir. SKN, medial-ventral hipotalamusta yerleşmiş, günün uzunluğunu yorumlayan küçük nöron demetlerinden oluşur (Çam ve Erdoğan, 2003) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Pineal bezde melatonin sentezinin kontrolu

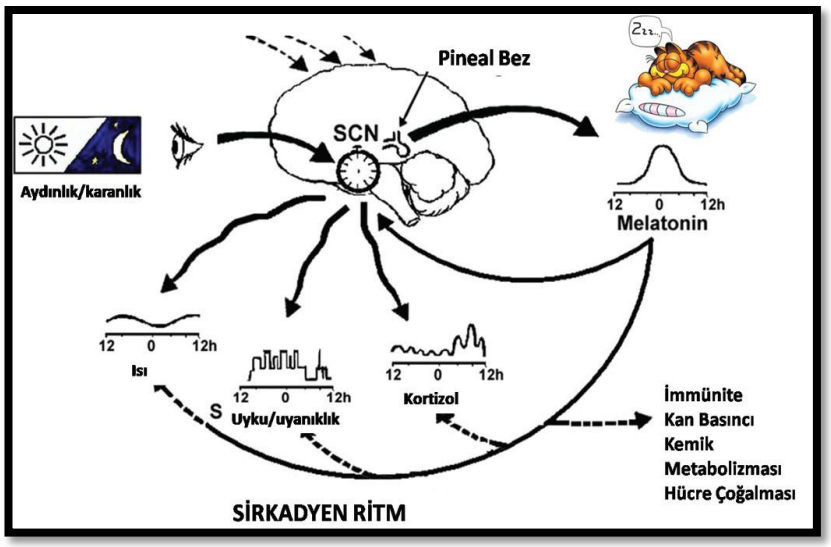
SCN; Suprakiazmatik nükleus, RH; retinohipotalamik, PVN; Paraventriküler nükleus, SCG; Superior servikal ganglion, NA; Norepinefrin, NAT; 5-Hidroksitriptamin-Nasetiltransferaz, HIOMT; Hidroksiindol-O-metiltransferaz (Çam ve Erdoğan, 2003)

2.2.6 Melatoninin fizyolojik etkileri

Melatonin sekresyonunun aydınlık/ karanlık siklüsü ile ilişkisi bu hormonu endojen bir senkronizör olarak düşündürmektedir (Arendt ve Skene 2005).

İnsanda pekçok biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal değişkenlerde olduğu gibi plazmadaki melatonin düzeyleri de 24 saatlik periyod içinde düzenli iniş çıkışlar

gösterir. Bu sirkadiyen ritm hipotalamusda SCN'deki santral pacemaker'lar tarafındankontrol edilir ve ritmin başlıca ayarlayıcısı dış ortamdaki aydınlık/karanlık siklusudur (Şekil 2.6). Gece ışığa maruz kalındığında pineal fonksiyonlar akut olarak baskılanır (Liebmann, 1997).



Şekil 2.6 Melatoninin ritm düzenleyici rolü (Şener 2010)

Melatoninin endojen senkronizör rolünde kortizol salgılanması ile ilişkisi de önemlidir. Adrenal bezde bulunan melatonin reseptörleri fizyolojik dozlarla uyarıldığında ACTH-aracılı kortizol oluşumunu baskılar (Campino 2008). Melatonin ile kortizol ilişkisi her iki hormonunda immun sistemde etkileri yönünden önemlidir. Melatonin ve kortizol düzeyleri ters yönde hareket eder. Kortizol akşam yatma saatlerinde düşüktür, oysa melatonin kortizol tam olarak düştükten birkaç saat sonra pik yapar. Normal salgılama düzeninin bozulması sağlığın bozulması ya da kanser riski açısından bu durum önemlidir. Araştırıcılar düşük melatonin ve yüksek kortizol seviyelerinde çeşitli hastalıkların ortaya çıkabilecegini bildirmişlerdir. Yani bu iki hormon arasındaki denge sağlıklı olmak için önemlidir (Millet vd.1999, Guardiola-Lemaitre 2007).

2.2.7 Işık ile melatonin salınımında ki değişiklik

Körlerde ışık algılaması "0" olan kişilerde melatonin sekresyonu 24 saat içinde serbest olarak dağılım göstermektedir (Reiter 1991, Reiter 2002). Gece oluşturulan yapay aydınlık melatonin sentez ve salgılanmasını akut olarak baskılarken, akşam karanlığın başlamasıyla birlikte uygulanan ışık gece 02.00-04.00 arası görülen plazma melatonin konsantrasyon pikinde kaymaya buna karşılık sabah henüz hava ağarmadan ışık uygulama ise bu konsantrasyon pikinin erken belirmesine neden olur. Sabah ve akşam saatleri maruz kalınan aydınlık ise fazda daralmaya neden olur (Claustrat vd.1998).

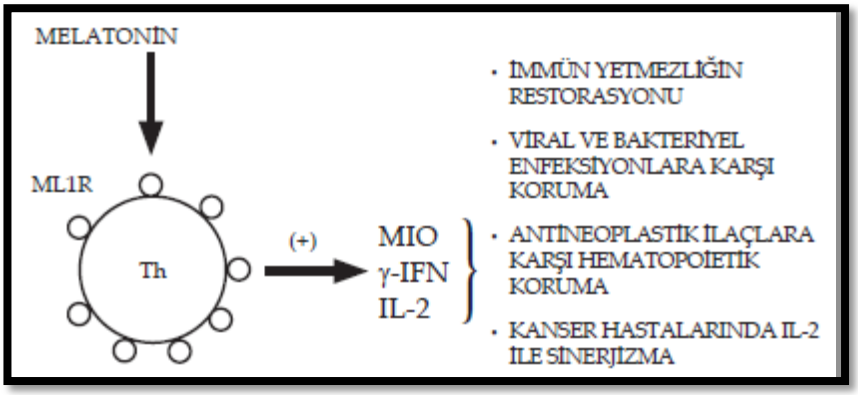
2.2.8 Melatoninin yaşa bağlı değişimi

Melatonin anneden fetusa ve süt yoluyla yenidoğana geçebilir ve dolayısıyla fetus ve yeni doğanda sirkadyen ritm bu yolla oluşur. Melatonin konsantrasyonu yaşa bağlı değişim gösterir, yeni doğanda sekresyon çok düşüktür, doğumdan kısa bir süre sonra artarak 1-3 yaş arası pik yapar ve sonra tekrar düşer. Bundan sonra sekresyon puberte ve adolesan dönemde sirkadyen hale gelir. Yirmili yaşlardan sonra melatoninin sentez ve salgılanma hızı azalarak 60'lı yaşlarda en düşük seviyelere ulaşır (Waldhauser vd.1984). Cinsiyetin melatonin salınımı üzerine etkisi yoktur (Fourtillan vd. 2001).

2.2.9 Melatoninin immünolojik etkisi

Melatoninin immünolojik rolüne ait ilk bulgu Maestroni ve arkadaşlarına aittir (1987). Farelerin devamlı ışığa maruz kalması veya gece β-adrenerjik reseptör blokörlerinin uygulanımı gibi melatonin oluşumunun inhibe edildiği şartlarda immun fonksiyonların baskılandığı görülmüştür. Sonraki çalışmalardan alınan sonuçlar melatoninin humoral ve hücresel immun yanıtı artırdığını desteklemiştir. Melatoninin bu etkisi normal şartlarda belirgin değildir. Yaşlanma, viral hastalıklar, kortikosteroid kullanımı veya akut stress gibi immun sistemin baskılandığı durumlarda etki belirgin hale gelmektedir (Reiter ve Maestroni 1999, Reiter vd. 2000, Maestroni 1995). Wichmann ve arkadaşları farelerde yumuşak doku travması ve hemorajik şok sonucu immun fonksiyonlardaki baskılanmanın melatonin ile geri çevrildiği, ayrıca kronik melatonin tedavisinin insanda

lökosit doğal öldürücü aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir (Wichmann, 1996). Ayrıca melatonin yardımcı T lenfositler üzerine etki etmek suretiyle immunoopioid peptidlerin salınımını stimüle eder (Şekil 2.7). Böylece interlökin-2 ve ɣ-interferon salınımını artırırlar (Maestroni ve Conti, 1994). Yine rat timüs bezinde melatonin bağlayan reseptörlerin varlığının gösterilmesi de, pineal bezin immün sistemde oldukça önemli bir yere sahip olduğu görüsünü destekler (Maestroni ve Conti 1991).



Şekil 2.7 Melatoninin immün sisteme etkileri (Maestroni 1995)

2.2.10 Melatoninin antioksidan etkisi

Melatonin hem yağda hem de suda çözünür özelliğe sahip olması nedeniyle, vücudun her hücresine, sitozole ve hücre içindeki diğer yapılara kolaylıkla girer ve bu sebeple de vitamin ve mineral antioksidanlara göre çok daha etkilidir (Reiter vd.2000). Böylece dejeneratif ve proliferatif değişikliklere neden olan hastalıklara karşı nükleer DNA'yı, membran lipidlerini ve sitozolik proteinleri korur (Brzezinski 1997, Reiter vd. 2000).

2.2.11 Melatoninin anti-apoptotik etkileri

Melatoninin apoptozun regülasyonundaki ilk bulgusu 1994 (Maestroni vd.1994) yılında verilmiştir. Bunu takiben pek çok deneysel çalışmada apoptoz üzerine melatoninin etkileri incelenmiş ve sonuçlar 3 başlık olarak özetlenmiştir;

1. İmmün hücrelerdeki apoptozun inhibisyonu (antiapoptotik etki);

2. Nöronal hücrelerdeki hücre ölümünün önlenmesi (antiapoptotik etki);
3. Kanser hücrelerinde apoptozun hızlandırılması (proapoptotik etki).

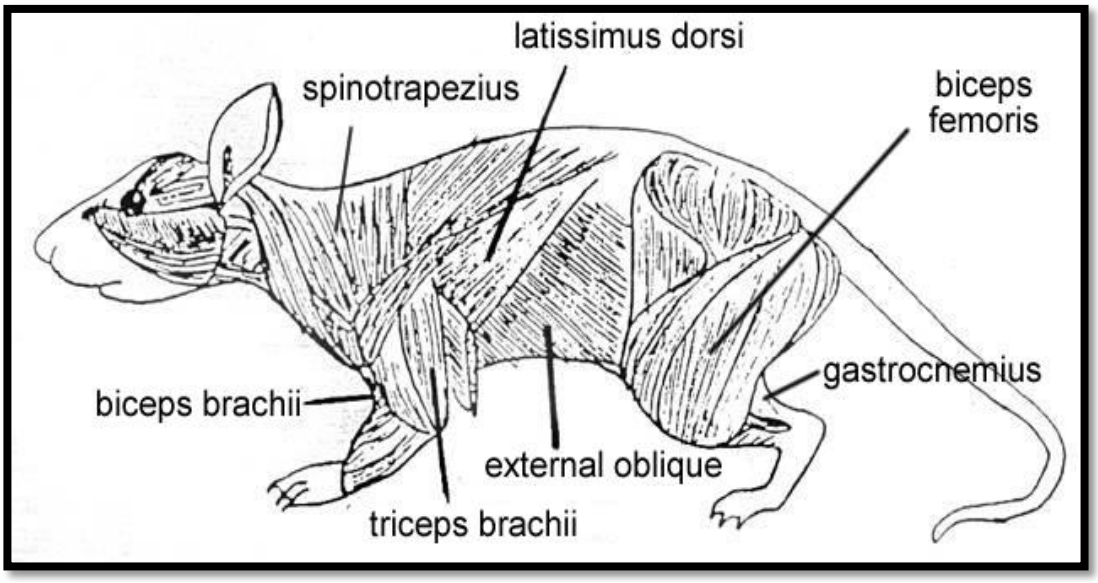
Bu başlıklar altında yapılan tüm çalışmalar sonuç olarak melatoninin apoptozdaki etkilerinin mekanizmasını, apoptozda oksidatif stresin önemini ve melatoninin antioksidan etkilerinin apoptozdaki rolünü de ortaya çıkarmıştır (Şener 2010).

2.3 Gastrocnemius Kası ve Anatamosi

Bacağın arka tarafında yer alan kalın bir kastır. Caput laterale ve caput mediale diye iki başı vardır. Femur'un alt ucunun arka iki yanından başlar. İki caput'un kirişi tibia'nın ortası düzeyinde birbiriyle birleşerek tek bir tendo oluşturur. Bu tendo m. soleus'un kirişi ile birlikte tendo calcaneus communis'i şekillendirir ve tuber calcanei'ye yapışarak sonlanır. Tendo calceneus communis'in oluşumuna m. biceps femoris'in, m. semitendinosus ve m. flexor digitorum superficialis'in aponörotik uzantıları da katılır.

M. gastrocnemius ayak ekleminin (articulatio pedis) ekstensoru, articulatio femorotibialis'in ise fleksoru olarak çalışır. N.tibialis tarafından innerve eldir (Dursun, 2006).

İskelet kasları; soleus, gastrocnemius ve ekstensor digitorum longus'u içermektedir. İskelet kas lifleri; hızlı- seğirme ve yavaş- seğirme lifleri olarak, enerji metabolizmaları ve liflerin kasılma karakterleri temel alınarak sınıflandırılabilinir (Brooke ve Kaiser 1970). Gastocnemius kası hızlı ve yavaş- kasılan liflerin ikisini birden içermektedir (Suwa vd.1998) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Gastocnemius kasının lateralden görüntüsü
(http /www.biologycorner.comworksheetsrat_external.html#.Usm7L_t_XjE)

2.4 İskelet kası fibrozisi

Fibroblastlar, dokular hasara uğradığında tamir için kollajen ve büyüme faktörleri içeren ekstraselüler matriks proteinleri salgılayarak iyileşme de önemli rol oynarlar (Bischoff, 1994, Kääriäinen 2000, Huard vd. 2002). İskelet kas fibrozisi kollajen ve diğer ekstaselüler matriks proteinlerinin kas fibroblastları tarafından üretilmesi ve dokularda birikmesidir (Li vd. 2008).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma 17.01.2012 tarih ve G.Ü ET-12.010 kodlu etik kurul kararı ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.1 Deney Hayvanları

Çalışmamızda, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden alınan Wistar albino tipi 200-220 gr 24 adet erkek rat kullanıldı ve deneyler GÜDAM'da yapıldı. Standart rat kafeslerinde optimal şartlarda standart pellet yem verildi. 12 saat gündüz, 12 saat gece olacak şekilde ışıklar ayarlandı.10 hafta sürecek çalışma için deneye başlamadan önce ratlar tartıldı ve ağırlıkları 200-220 gr olanlar arasından rastgele alınarak 6'şarlı 4 gruba ayrıldı.

3.2 Uygulanan Yöntemler

3.2.1 Araştırma planı

Sıçanlar her grupta 6 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

Deney grupları

1) Grup 1 (Kontrol 1, Mısır yağı)Bu gruptaki sıçanlara CCl_4 çözücüsü olan mısır yağı 1,5ml/kg 4 hafta boyunca subkutan olarak haftada iki kez 10 hafta boyunca uygulandı.

2) Grup 2 (Kontrol grubu, etanol+PBS)Bu gruba ise Melatonin çözücüsü olan %1 oranında etanol+PBS 10 hafta boyunca her gün subkutan olarak verildi.

3) Grup 3 (CCl_4) 1:1 oranında mısır yağında çözünmüş steril CCl_4 enjeksiyonunun başlangıcından hafta da iki kere 1,5ml/kg dozunda melatonin subkutan olarak verildi.

4) Grup 4 (CCl_4+Melatonin) CCl_4enjeksiyonunun başlangıcından itibaren günde 10mg/kg dozunda melatonin subkutan olarak verildi.

10. haftanın sonunda tüm deney gruplarından ketamin/rompun anestezisi altında intrakardiyak kan alınarak kas dokuları çıkarıldı.

3.3.2 Histokimyasal inceleme

Çizgili kas dokusunun bir kısmı %10'luk formole konularak tespit edildi. Tespitteki dokular rutin histolojik işlemlerden geçirildikten sonra parafine gömüldü ve 5µm kalınlığında kesitleralındı.Histolojik inceleme için dokular hematoksilen-eosin (HE) ile boyandı. Fibrosiz (Tip I kollajen) oluşumu Masson-Trikrom boyama ile glikojen tanecikleri Periyodik Asit Shift (PAS) boyama ile gösterildi.

Alkol serileri

1- %80 alkol 1 saat

2- %95 alkol 1 saat

3- Absolü alkol 1 saat

4- Absolü alkol 1 saat

5- Ksilen 1,5 saat

6- Ksilen 1,5 saat

7- 45 Cº'lik parafin 1,5 saat (2 defa)

8- 55 Cº'lik parafin 1,5 saat (2 defa)

9- 55 Cº'lik parafin ile blok yapıldı.

3.3.2.1 Hematoksilen & Eozin (H&E) boyama yöntemi

1. Parafinin uzaklaştırılması için kesitler iki defa ksilenden geçirildi.
   1. min 30 dakika
   2. min 30 dakika

2. Ksilenin uzaklaştırılması ve doku suyunun çekilmesi için azalan alkol serilerinden geçirildi.

Absolü etil alkol 5 dakika

Absolü etil alkol 5 dakika

%95 etil alkol 5 dakika

3. Çeşme suyundan geçirildi.

4. Harris hematoksileninde boyandı (10-15 dakika).

5. Çeşme suyundan geçirildi.

6. Asit alkolde diferansiye edildi (batırılıp çıkarıldı).

7. Tekrar çeşme suyundan geçirildi.

8. Scott'un solusyonunda 5-10 dakika mavileştirildi.

9. Birkaç dakika suda yıkandı.

10. 1-3 dakika eosinle zıt boyama yapıldı.

11. Bir dakika kadar eosinin fazlası gidene kadar akarsuyla yıkandı.

12. Kesitlerin suyunu almak için yükselen alkol serilerinden geçirildi.

%95 etil alkol 5 dakika

Absolü etil alkol 5 dakika

Absolü etil alkol 5 dakika

13. Alkolu uzaklaştırmak ve parlaklaştırmak için ksilenden geçirildi.

Ksilen 1-2saat

14. Entellan ile kaplandı.

3.3.3 Masson trikrom boyama yöntemi

1. Ksilol (iki kez en az 2-3 dakika), saf alkol, %95'lik alkol, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek parafinden kurtarıldı ve distile suda yıkandı.

2. 56º'de 15 dakika Bouin solüsyonunda mordanlandı.

3. Kesitler soğutulduktan sonra 5 dakika akan suda arıtıldı.

4. Distile sudan geçirildi.

5. Weigert'in Demirli Hematoksilen solüsyonunda 5 dakika tutuldu.

6. Tekrar çeşme suyunda 5-10 dakika yıkandı.

7. Deiyonize sudan geçirildi.

8. Diferensiasyon için Biebrich asit fuksin solüsyonunda 5 dakika tutuldu.

9. Deiyonize sudan geçirildi.

10. Fosfomolibdik- fosfotungstik asit solüsyonunda 5 dakika şeffalaştırıldı.

11. Anilin mavisi solüsyonunda 5 dakika tutuldu.

12. Distile sudan geçirildi.

13. %1'lik asetik asit solüsyonunda 2 dakika tutuldu.

14. %95'lik alkol, saf alkol ve ksilolden (her birinden 2'şer kez ve 5 dakika) geçirilerek şeffaflaştırıldı ve entellan ile kaplandı.

3.3.4 Periyodik asit schiff (PAS) boyama

1. Deparafinizasyon işleminden sonra kesitler distile su ile yıkandı.

2. Periyodik asit solüsyonunda 5 dakika tutuldu.

3. Çeşme suyundan geçirildikten sonra distile su ile yıkandı.

4. Schiff solüsyonunda 15 dakika bekletildi.

5. Çeşme suyundan geçirildikten sonra distile su ile yıkandı.

6. Gill III Hematoksilen solüsyonunda 2 dakika tutuldu.

7. Çeşme suyundan geçirildi.

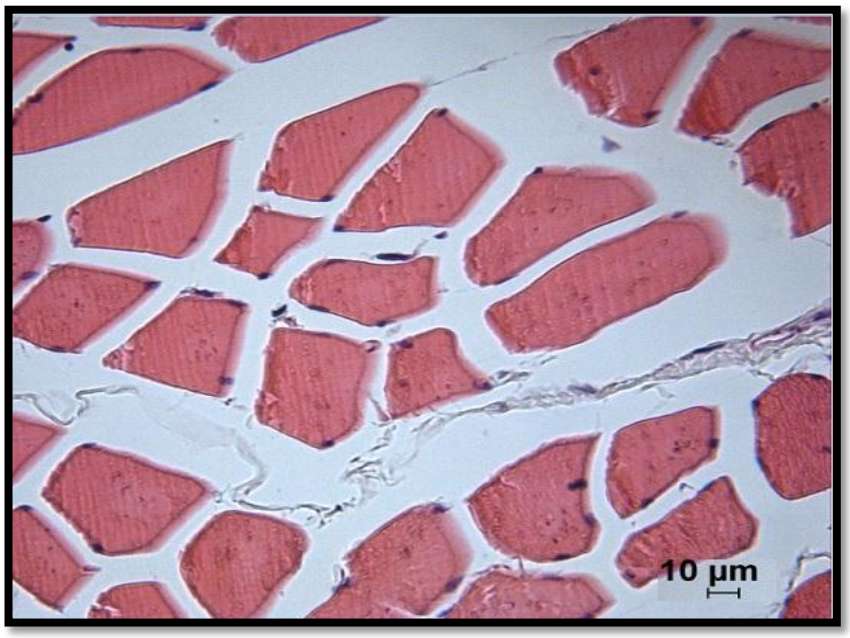
8. %95'lik alkol, saf alkol ve ksilolden (her birinden 2'şer kez ve 5 dakika) geçirilerek şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Histokimyasal Sonuçlar

4.1.1 Hematoksilen-Eosin (H&E)

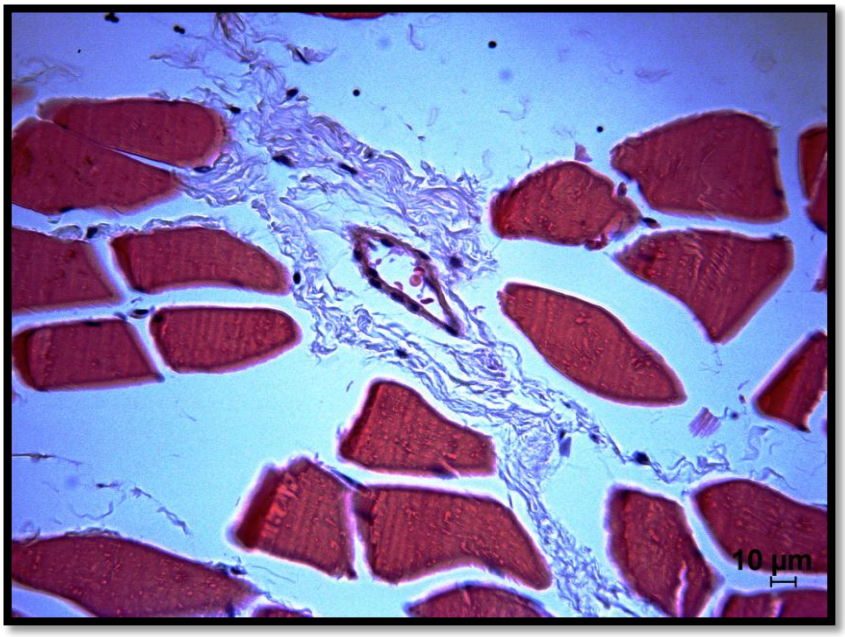
Kontrol grubu (Grup 1,2) sıçanların gastrocnemius kas dokusu kesitleri incelendiğinde, kas hücrelerininmorfolojik yapısının düzgün olduğu görülmektedir (Şekil 4.1- 4.2). Ayrıca damar çeperinin yapısı normal görünümdedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.1 Kontrol grubu (mısır yağı) sıçan gastrocnemius kasının histolojik yapısı. H&E

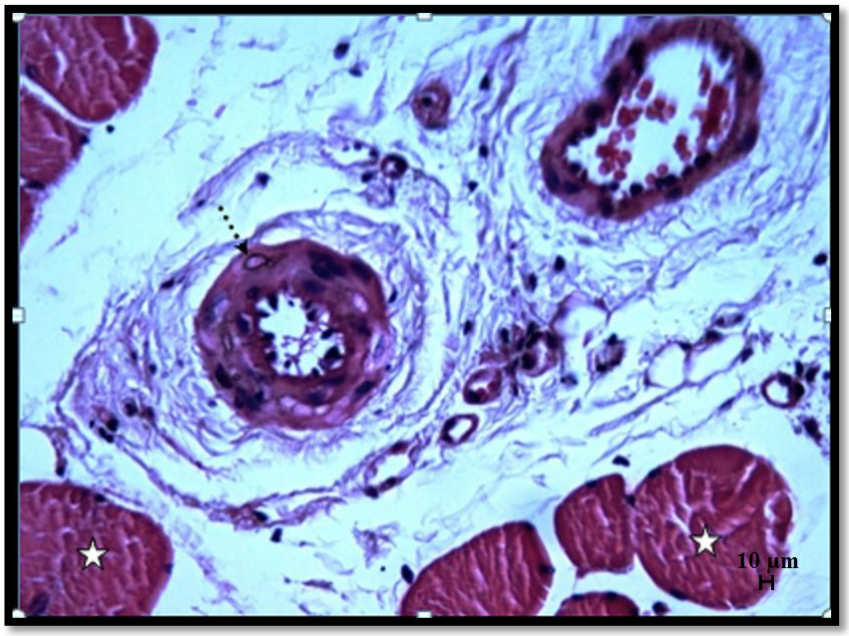


Şekil 4.2 Kontrol grubu (PBS+ etanol) sıçan gastrocnemius kasının histolojik yapısı H&E

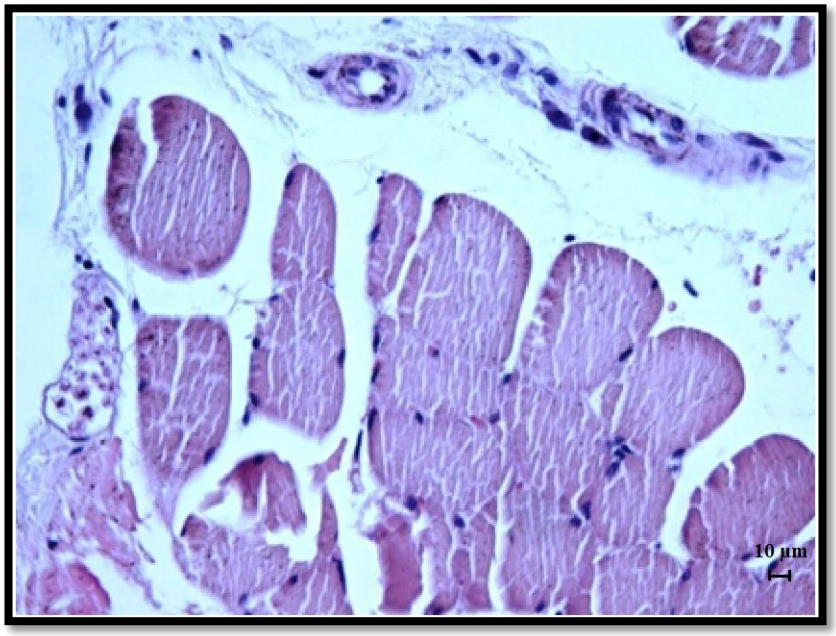


Şekil 4.3 Kontrol grubu (mısır yağı) sıçan gastrocnemius kasında damarın yapısı H&E

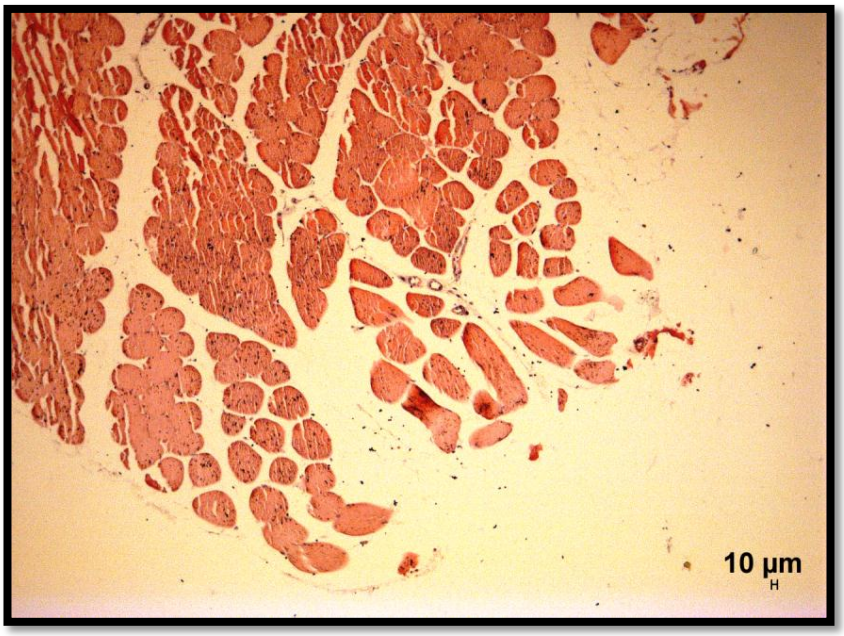
CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kası incelendiğinde kas fibrillerinde yer yer erime ile beraber kontraktil protein kaybı, kas dokusunda şekil bozukluğu ve kas hücrelerinde hipertrofi görüldü (Şekil 4.4 - 4.9) . Bununla beraber kan damarı çeperinde vakuoler dejenerasyona rastlandı (Şekil 4.4).



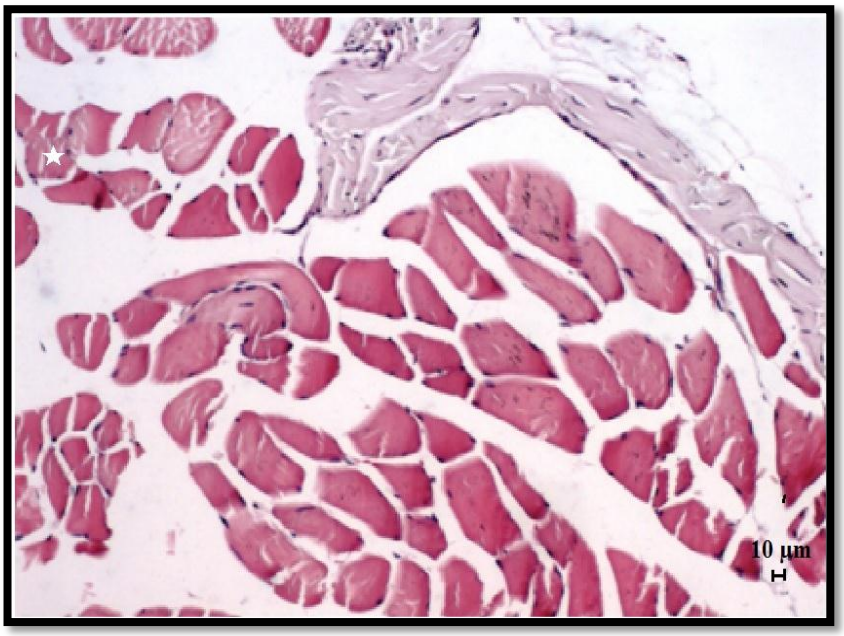
Şekil 4.4 CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kas liflerinde erime, perivasküler bağ doku artışı, vakuoler dejenerasyon ve hipertrofi H&E



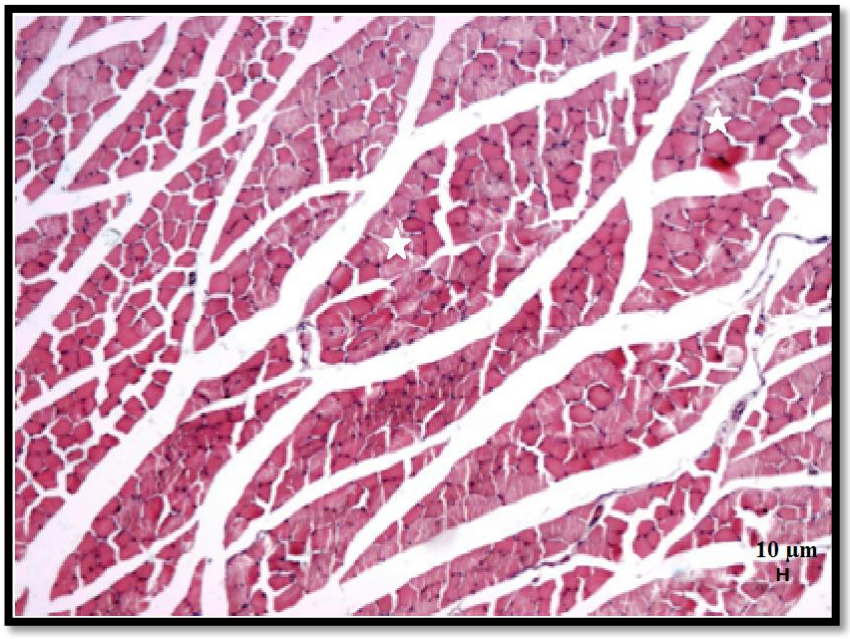
Şekil 4.5 CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kasında hipertrofi ve fibrillerde erime H&E



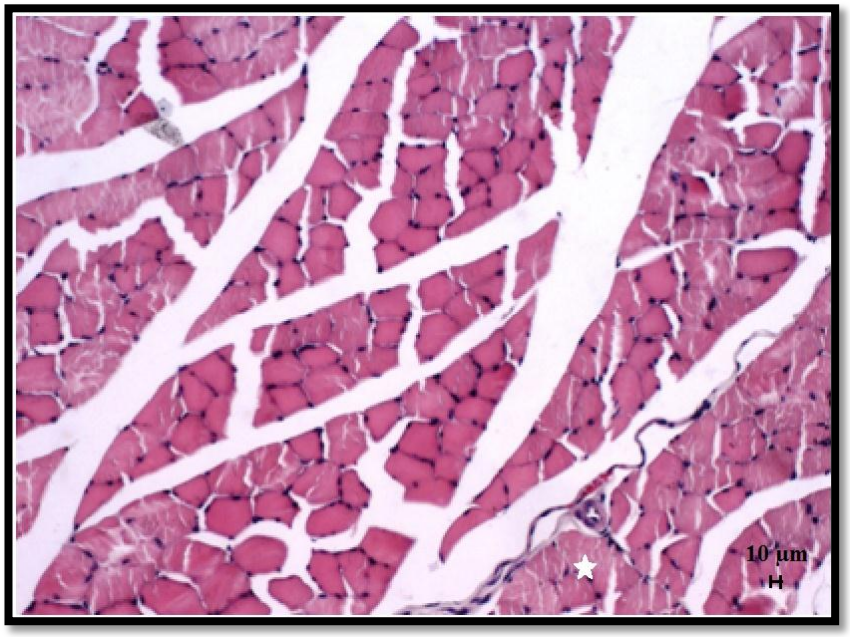
Şekil 4.6 CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kas hücrelerinde hipertofi H&E



Şekil 4.7 CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kas fibrillerinde erime ve fibrozis H&E

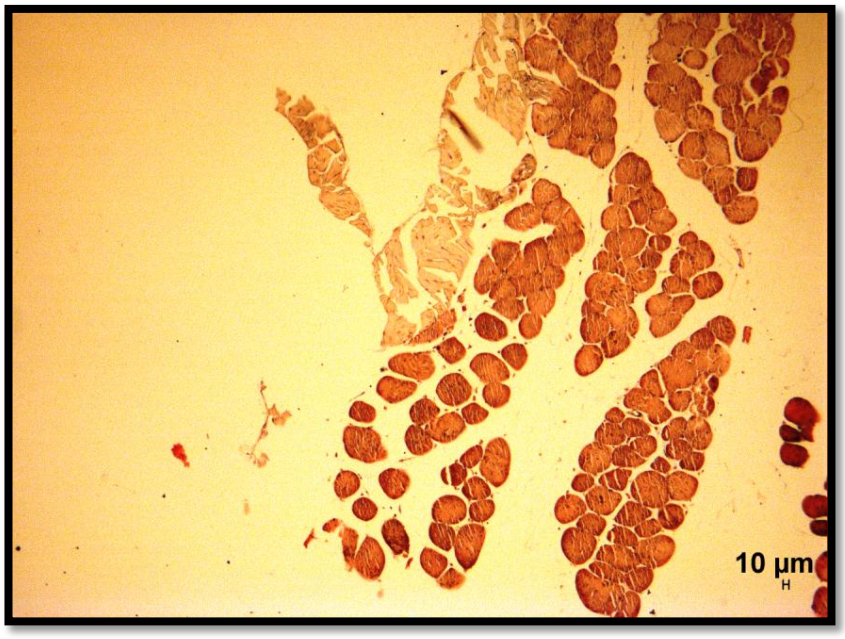


Şekil 4.8 CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kas hücrelerinde erime ve morfolojik karakterde bozulma H&E



Şekil 4.9 CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kas fibrillerinde kontraktil protein kaybı ve oryantasyon bozukluğu H&E

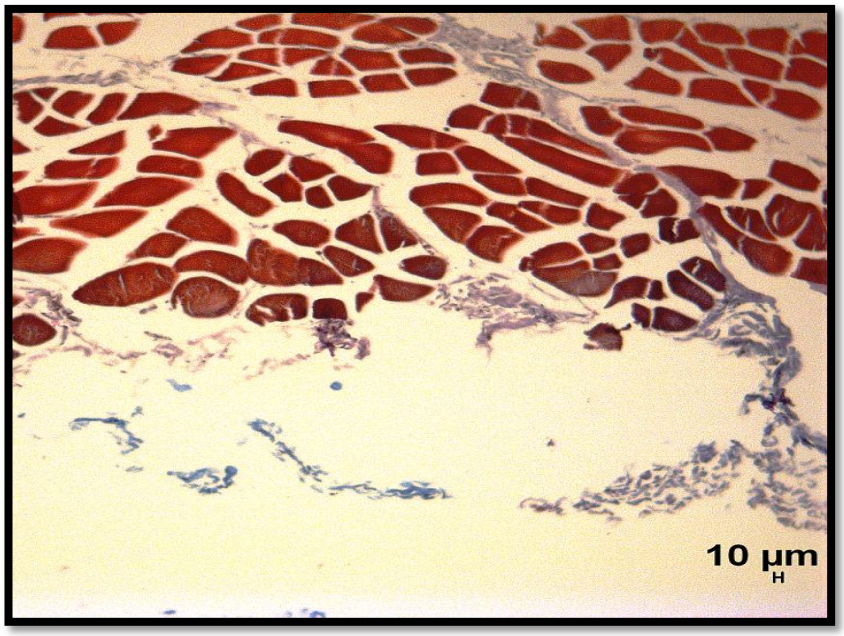
Melatonin uygulanmış CCl_4 grupları incelendiğinde CCl_4'lü gruba göre doku bütünlüğünün kısmen korunduğu ve hücrelerin morfolojik yapısının normale yakınolduğu saptandı (Şekil 4.10).



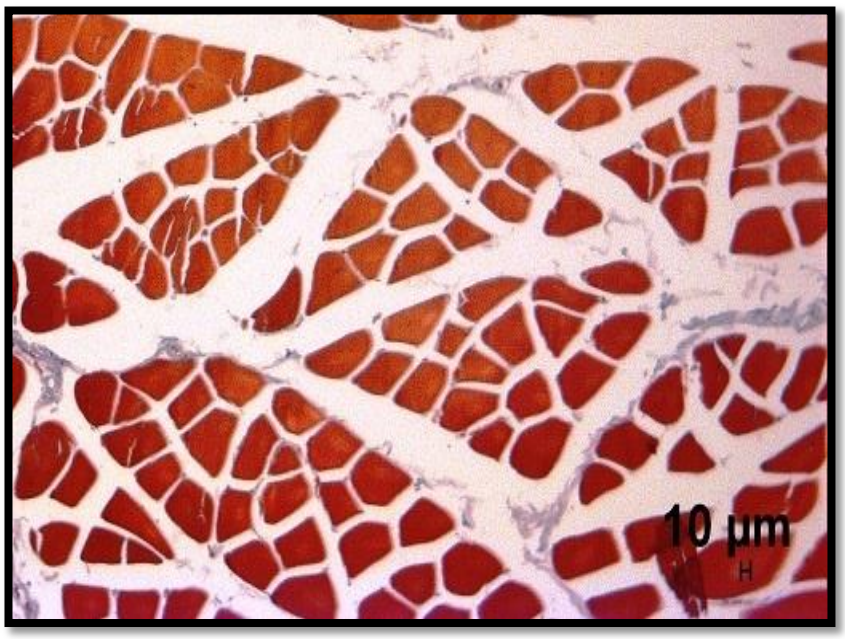
Şekil 4.10 Melatonin uygulanmış CCl_4 grubu sıçanların gastrocnemius kas hücreleri normale yakın bir görünüm izlemekte.

4.1.2 Masson-Trikrom

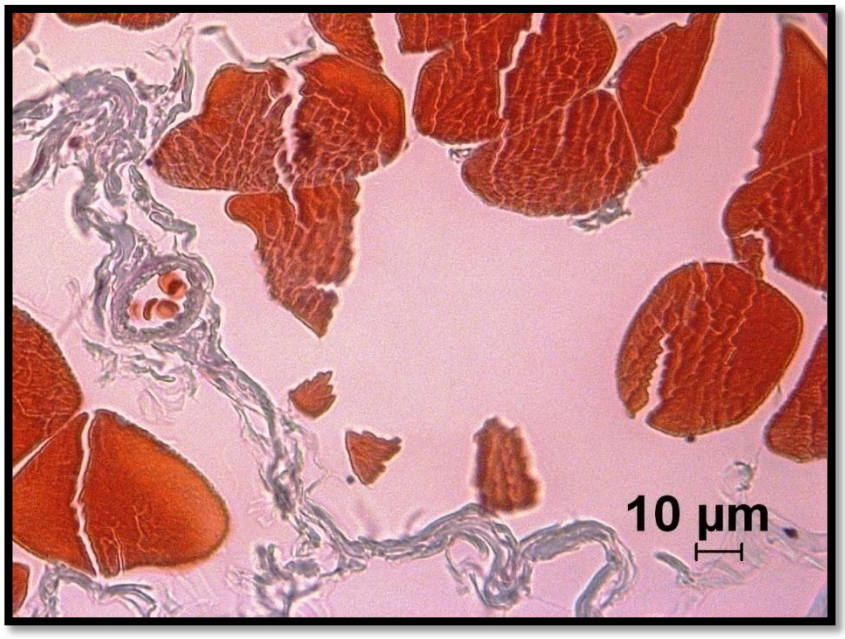
Masson-Trikrom ile boyanmış kas hücresi çekirdeği siyah, kollajen lifler ise mavi renkte boyanmıştır. Kontrol grubunda kollajen lifler normal düzeydedir (Şekil 4.10-4.11). Kontrol grubunda kan damarı çeperinde herhangi yapısal bir bozukluk görülmemistir (Şekil 4.13).



Şekil 4.11 Kontrol grubu (mısır yağı) sıçan gastrocnemius kasında bağ doku. Masson-Trikrom



Şekil 4.12 Kontrol grubu (PBS+ etanol) sıçan gastrocnemius kasında bağ doku.Masson-Trikrom

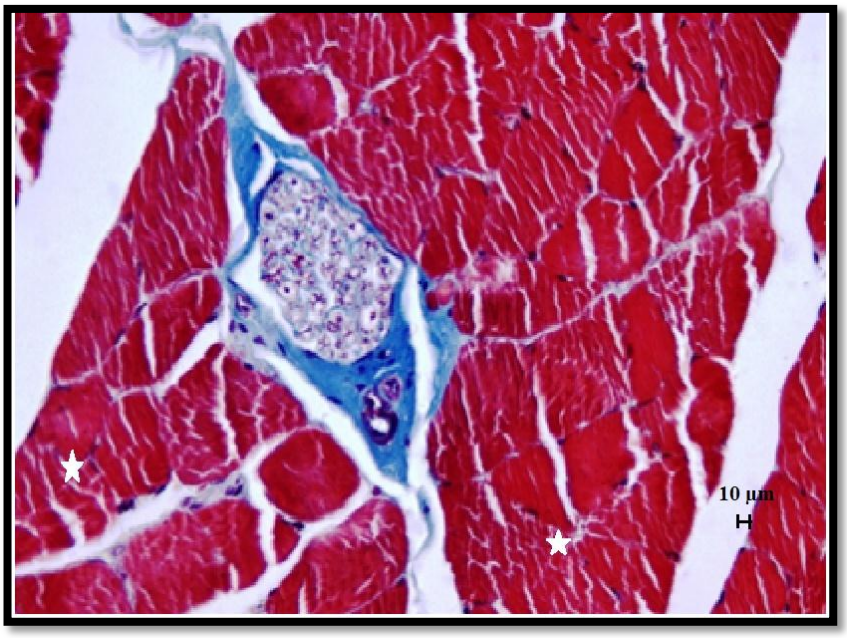


Şekil 4.13 Kontrol grubu (mısır yağı) sıçan gastrocnemius kasında damarın yapısı. Masson-Trikrom

CCl_4 uygulanan grupta sinir pleksusu etrafında fibrozis, kas hücrelerindeoryantasyon bozukluğu ve hipertrofiyle beraber kan damarları etrafında da kollejen artışı görülmüştür (Şekil 4.14- 4.17). Ayrıca anjiyogenezise rastlanmıştır (Şekil 4.14, Şekil 4.16).



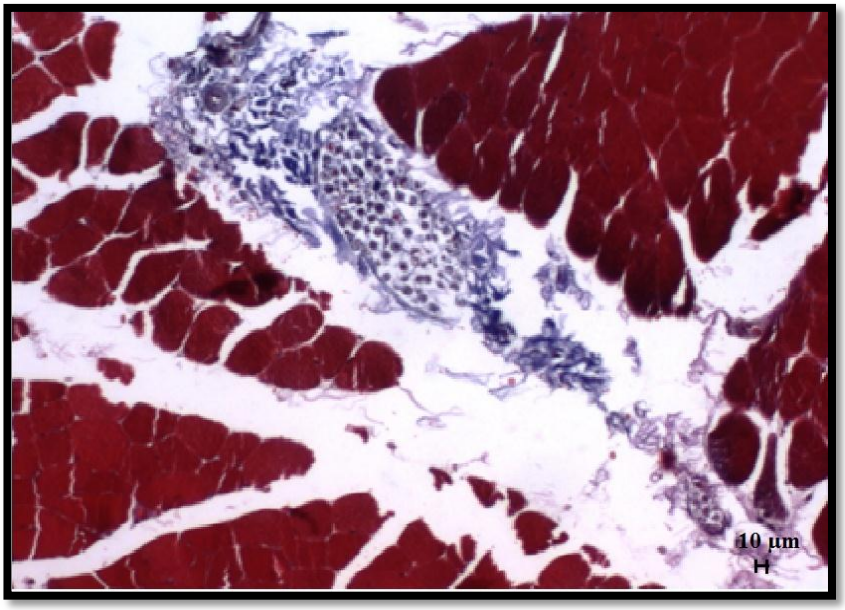
Şekil 4.14 CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında kan damarları etrafında kollajen lif artışı ve kas fibrillerinde erime ve anjiyogenezis. Masson-Trikrom



Şekil 4.15 CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında sinir pleksusları etrafında fibrozis ve oryantasyon bozukluğu. Masson-Trikrom



Şekil 4.16 CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında sinir pleksusları etrafındakollajen lifte ve periovasküler bağ doku da artış ve anjiyogenezis. Masson-Trikrom

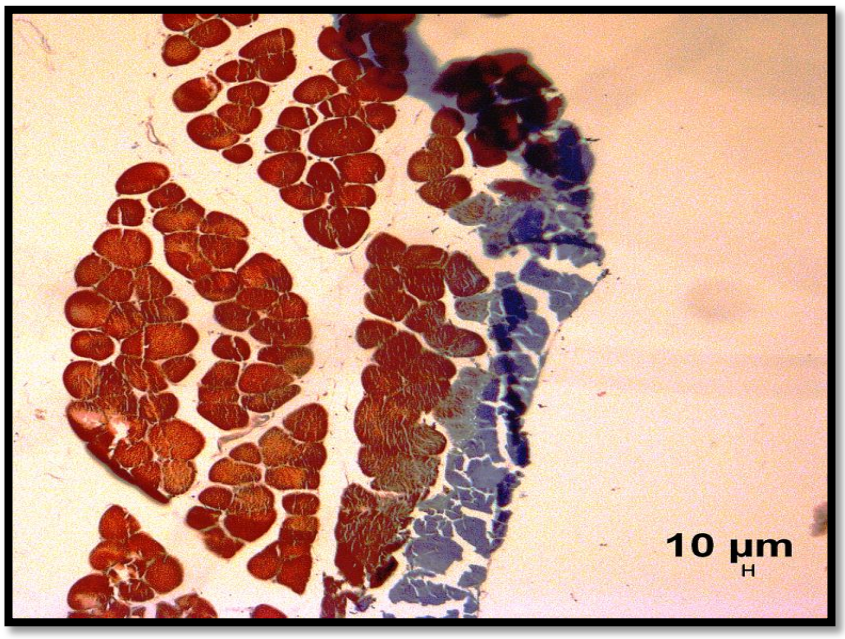


Şekil 4.17 CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında sinir pleksusları etrafında fibrozis, oryantasyon bozukluğu ve fibrillerde erime. Masson-Trikrom

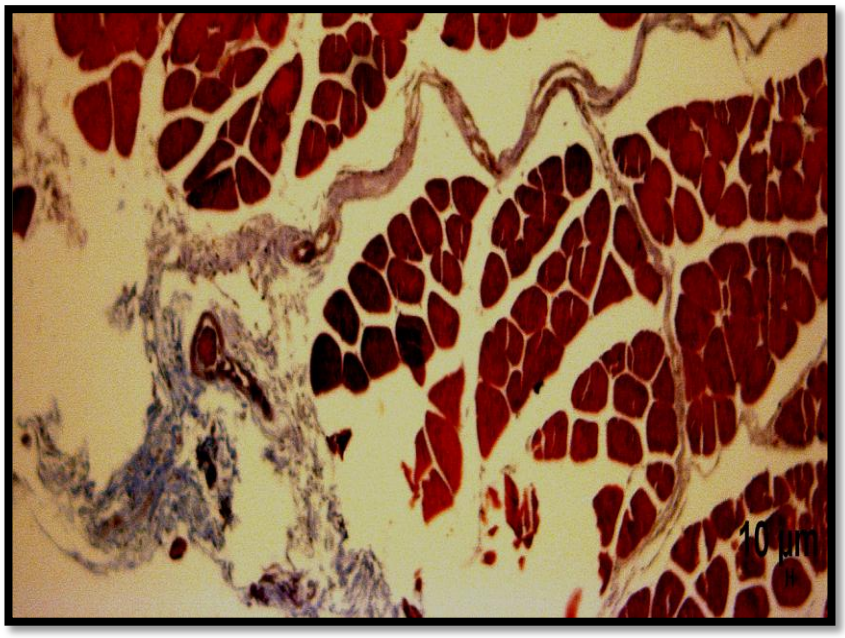
Melatonin uygulanmış CCl_4 grupları incelendiğinde CCl_4'lü gruba göre doku bütünlüğünün kısmen korunduğu, kollajen lifte azalma ve kan damarı etrafında fibroziste azalma gözlenmiştir (Şekil 4.18 - 4.22). Bu grupta melatoninin vakuoler dejenerasyona ve damar çeperindeki bozulmaya etkisi olmadığı tespit edildi (Şekil 4.20 - 4.21).



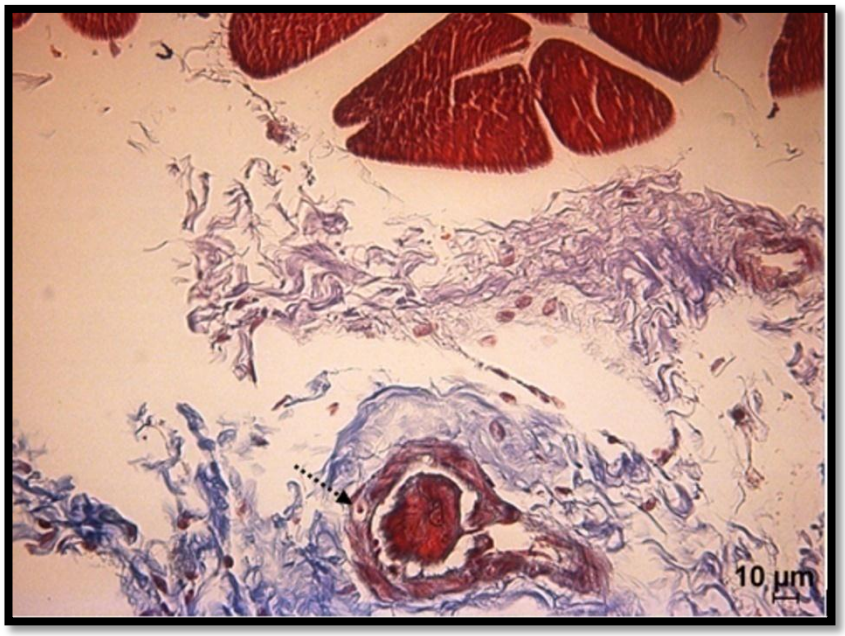
Şekil 4.18 CCl_4+melatonin grubunda ait gastrocnemius kası. Masson – Trikrom



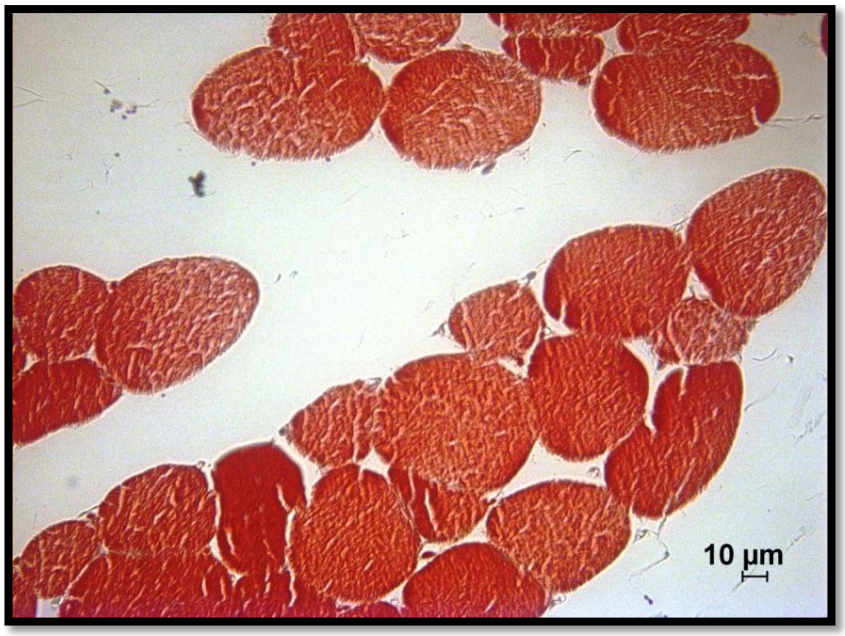
Şekil 4.19 Melatonin uygulanmış CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında kollajen lifte azalma ve normale yakın doku görünümü. Masson-Trikrom



Şekil 4.20 Melatonin uygulanmış CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında kan damarı etrafında kollajen lif artışı. Masson-Trikrom



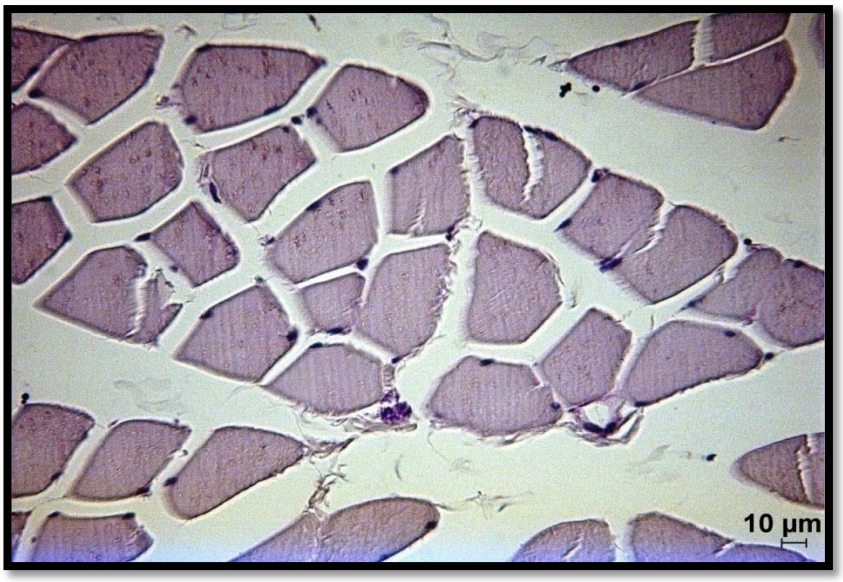
Şekil 4.21 Melatonin uygulanmış CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında periovasküler bağ dokusu artışı. Masson-Trikrom



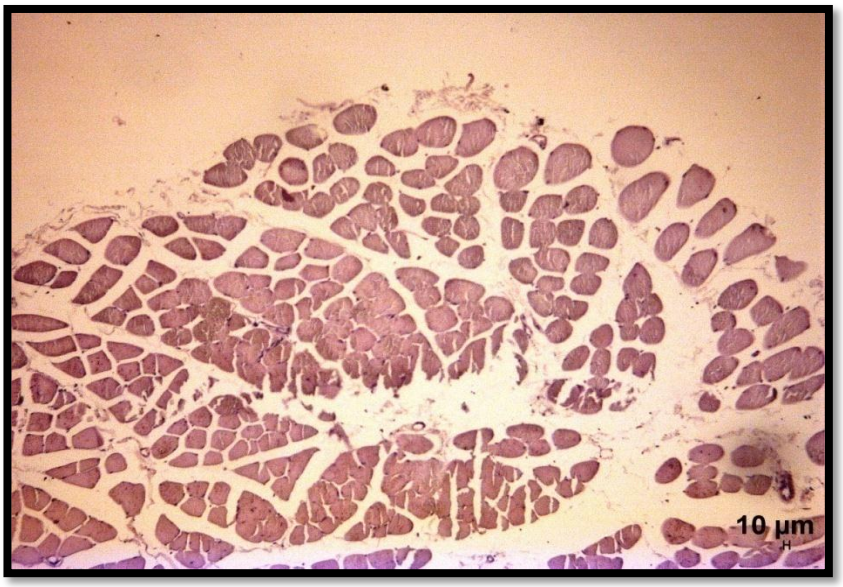
Şekil 4.22 Melatonin uygulanmış CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kas hücrelerinde hipertrofi. Masson-Trikrom

4.1.3 Periyodik Asit-Schiff (PAS)

Kontrol gruplarındaki (Grup 1,2) sıçanların gastrocnemius kas dokusu incelendiğinde bütün grupların PAS pozitif reaksiyon verdiği gözlemlendi. Kontrol gruplarında bağ dokusunun normal düzeyde, çekirdeklerin birden fazla ve kenarda olduğu, hücrelerin normal boyutta olduğu, doku bütünlüğünün olduğu gözlemlendi (Şekil 4.23 - 4.24).

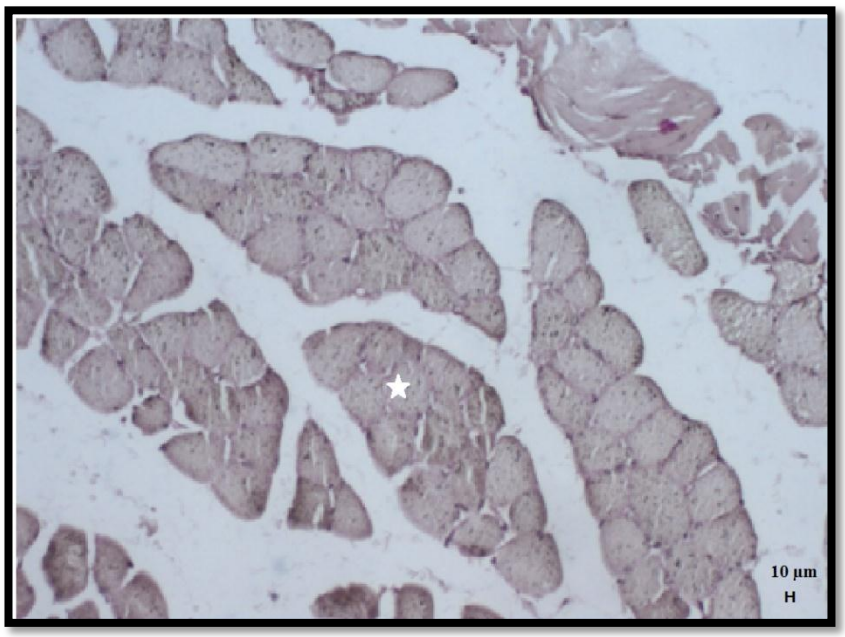


Şekil 4.23 Kontrol grubu (mısır yağı) sıçan gastrocnemius kası PAS pozitif. PAS

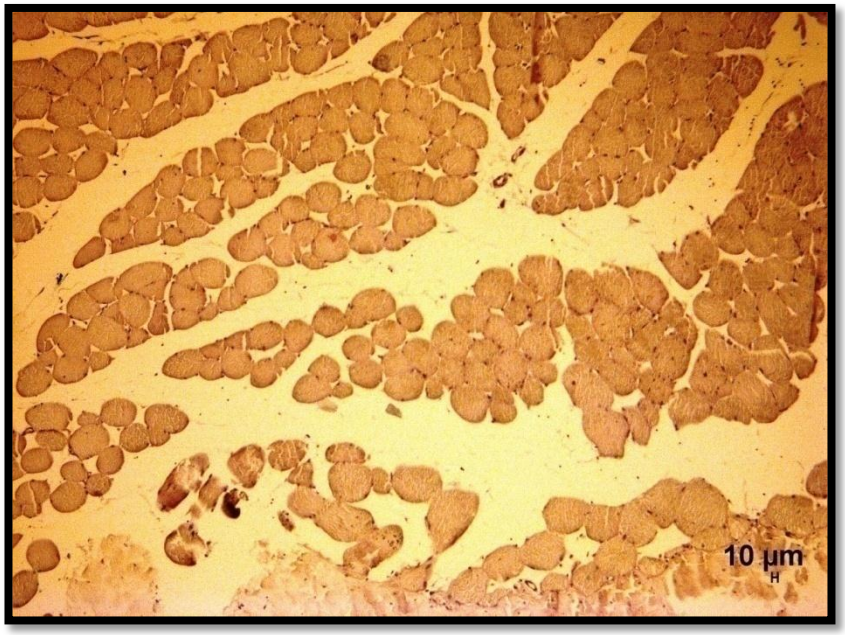


Şekil 4.24 Kontrol grubu (PBS+ etanol) sıçan gastrocnemius kası PAS pozitif PAS

CCl_4 uygulanmış gruplar incelendiğinde yine PAS pozitif reaksiyon verdiği bununla birlikte kas fibrillerin de yer yer erime ve hipertrofi gözlemlenmiştir (Şekil 4.25 - 4.26).

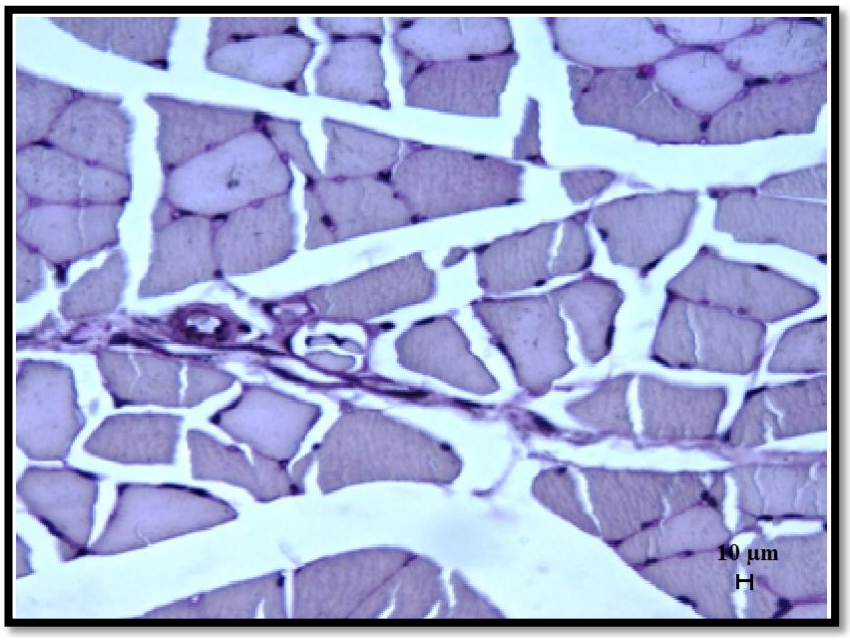


Şekil 4.25 CCl_4 uygulanmış sıçan gastrocnemius kası PAS pozitif ve kas fibrillerinde erime PAS

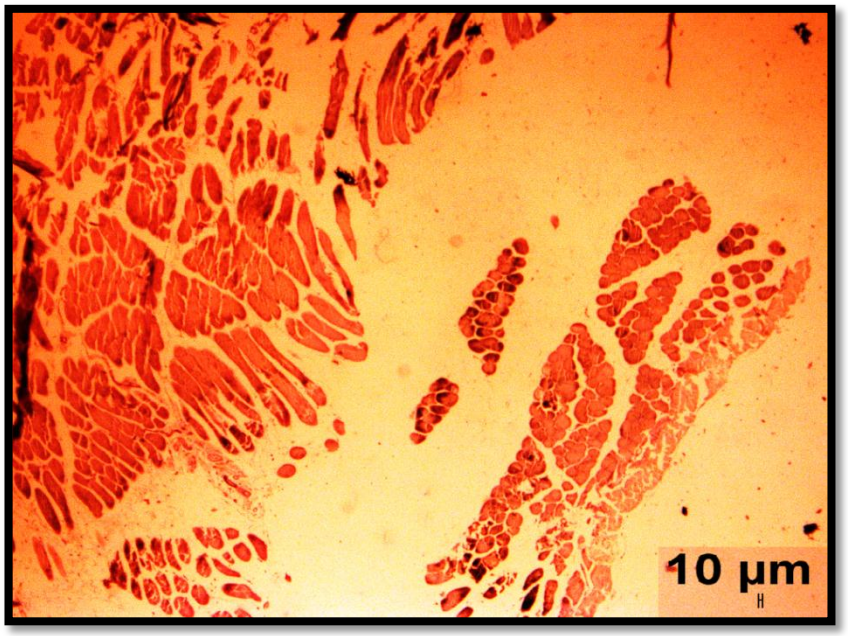


Şekil 4.26 CCl_4 uygulanmış sıçan gastrocnemius kası PAS

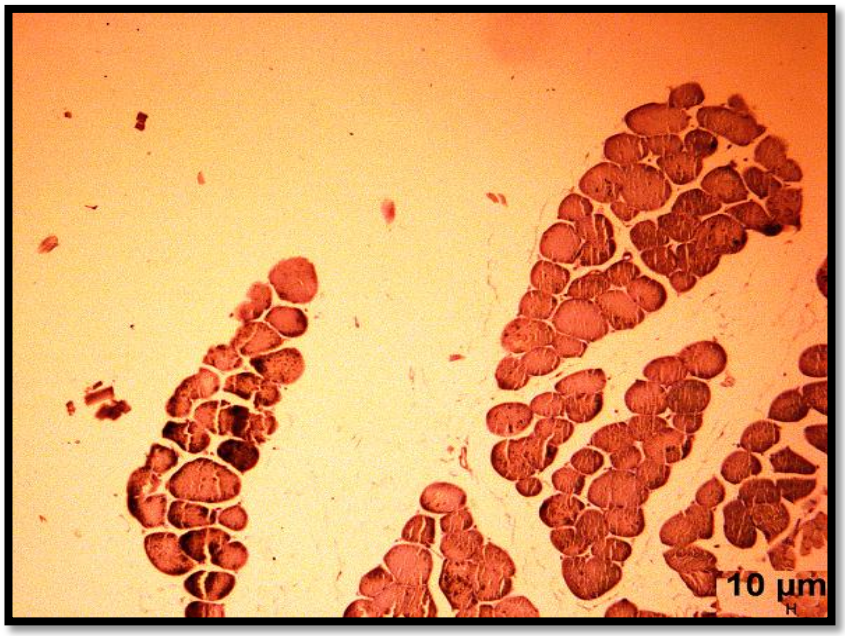
Melatonin uygulanmış CCl_4 grupları incelendiğinde PAS pozitif reaksiyon vermiştir. CCl_4'lü gruba göre kollajen lifte azalma vekas fibrillerinde normale yakın görünüm izlenmiştir (Şekil 4.27 - 4.31).



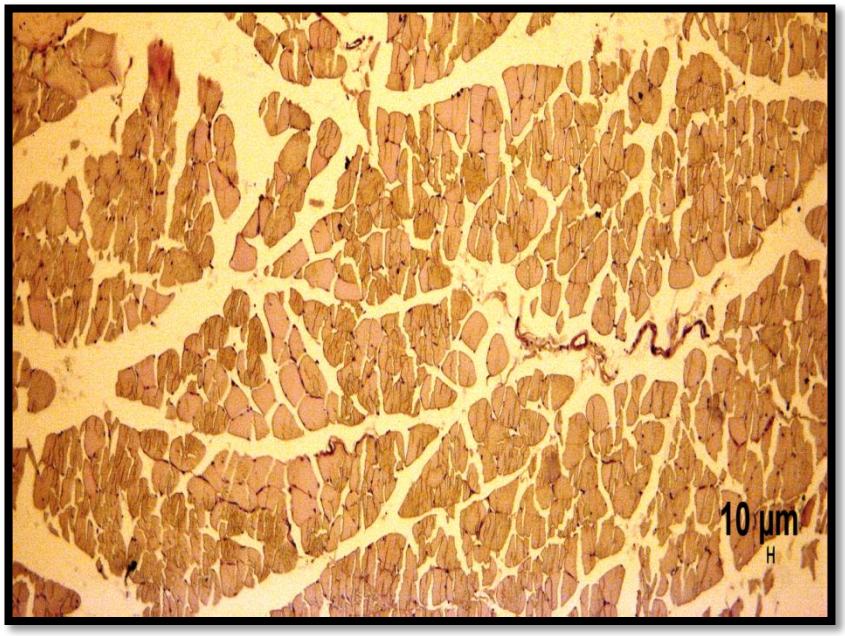
Şekil 4.27 Melatonin uygulanmış CCl_4 grubu sıçan gastrocnemius kasında kollajen lifte azalma ve fibrillerde normale yakın görünüm PAS



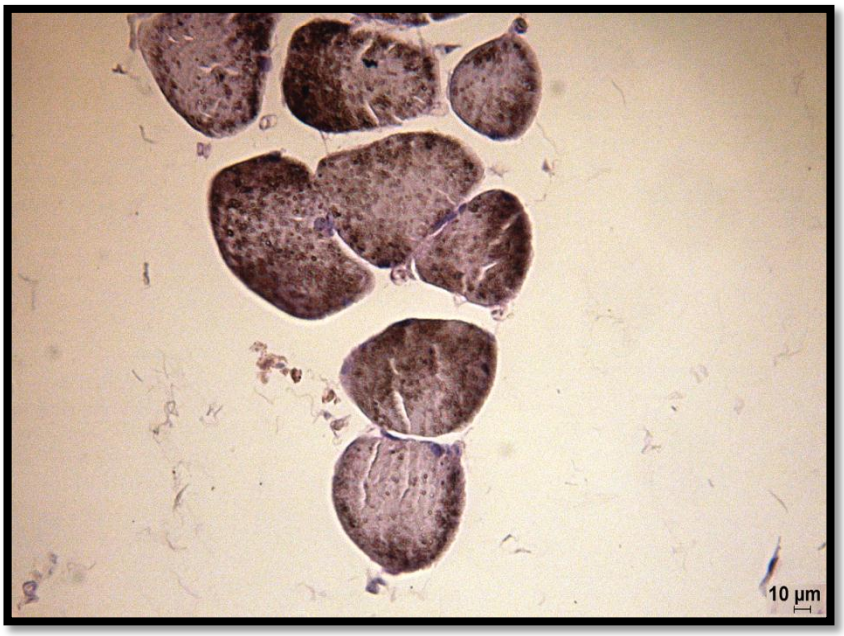
Şekil 4.28 CCl_4+melatonin grubuna ait gastrocnemius kası PAS



Şekil 4.29 CCl_4+melatonin grubuna ait gastrocnemius kasında kısmen düzelme, normale yakın görünüm PAS



Şekil 4.30 CCl_4+melatonin grubuna ait gastrocnemius kasında kollejen lifte azalma, normale yakın görünüm PAS



Şekil 4.31 CCl_4+melatonin grubuna ait gastrocnemius kasında kollejende lifte azalma, normale yakın görünüm PAS

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fibroblastlar, dokular hasara uğradığında tamir için kollajen ve büyüme faktörleri içeren ekstraselüler matriks proteinleri salgılayarak iyileşme de önemli rol oynarlar (Bischoff, 1994, Kääriäinen, 2000, Huard vd. 2002). İskelet kas fibrozisi kollajen ve diğer ekstaselüler matriks proteinlerinin kas fibroblastları tarafından üretilmesi ve dokularda birikmesidir (Li vd. 2008).

Serbest radikaller paylaşılmamış elektron içeren reaktif ve kısa ömürlü moleküllerdir. Bu moleküller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de ilaçların ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisiyle oluşabilir (Cross vd.1987). Normal koşullarda serbest oksijen radikalleri ve radikal toksisitesi ile koruyucu antioksidan sistem üretiminde bir denge vardır. Antioksidan ve oksidanlar lehine bozulması oksidatif stres olarak bilinir. Oksidatif stres hastalıklarda hücresel ve moleküler doku hasarı oluşum mekanizmalarının bir parçasıdır (Freeman ve Crapo 1982, Ercan ve Fidancı 2012).

Kimyasal doku toksisitesi oluşturma da sıklıkla kullanılan CCl, kokusuz, renksiz, ağır ve alev almayan sıvı bir maddedir ve serbest radikal oluşturarak; karaciğer, böbrek, akciğer, kalp, testis, beyin ve kan gibi dokulara etki eder (Ahmad vd.1987, Ozturk vd. 2003). Dokularda hasar oluşturma mekanizması, CCl_4'ün sitokrom P450 enzimi aracılığıyla oldukça toksik triklorometil (CCl_3) ve triklorometil peroksil (CCl_3O_2) serbest radikaline dönüşümü sonrası başlayan sitoplazmik zar lipit peroksidasyonu ile ortaya çıkan oksidatif hasar olarak açıklanmıştır (Farombi, 2000). Serbetçi vd. (2012), Spraque- Dawley sıçanlarda CCl_4 uygulayarak akut karaciğer hasarı oluşturmuşlar. Karbontetraklorür verilen grupta sentral venlerde az tıkanıklık ve şiddetli tıkanıklık gözlemlemişlerdir portal venlede ayrıca kontol grubuna kıyasla sinosoidlerde azalma olduğunu histokimyasal olarak göstermişerdir. CCl4'ün karaciğer hasarını biyokimyasal olarakta göstermişlerdir.

Mıyazakı vd. (2004), sıçanlara 10 hafta boyunca CCl_4 uygulamış kan, beyin, karaciğer ve iskelet kas dokularını almış ve CCl_4 'ün etkisini araştırmışlardır. Bu dokularda

CCl_4'ün fibrozis oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak kas analizlerini biyokimyasal olarak göstermişlerdir.

Vural vd. (2013), 12 hafta boyunca Wistar albino sıçanlara CCl_4 uygulamış ve 12 haftanın sonunda soleus kaslarını almış histolojik olarak incelemişlerdir. Sonuç olarak kaslarda hipertopi, kas hücrelerinde oryantasyon bozukluğu ve fibrozis gözlemlenmiştir. Bu çalışmalara benzer şekilde bizim çalışmamızda kontrol gruplarıyla kıyaslandığında CCl_4 verilen grupta kasta hipertrofi, kas hücrelerinde oryantasyon bozukluğu, kan damarları etrafında fibrozis ile birlikte sinir pleksusları etrafında kollajen liflerde artış gözlemlenmiştir. Ayrıca fibrillerde erime görülmüştür.

Çalışmamızda melatoninin etkisi araştırılmak amacıyla CCl_4+MEL (10 hafta) grubu oluşturuldu.

Nöroendokrin bir organ olan pineal bezin (Erlich, 1985) hormonu melatonin, çok güçlü ve etkili bir endojen radikal toplayıcısıdır. Toksik hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek, bütün hücre kompartmanlarındaki biyomolekülleri, oksidatif hasara karşı bölgesel olarak yerinde korur. Melatoninin difüzyon yeteneği, radikal toplayıcı etkisi için çok önemlidir. Bu sayede bütün hücrelere girer (Burton 1994).

Erdem vd. (2010), akut iskemi/reperfüzyon(İ/R) yaralanması oluşturulan Wistar albino türü sıçanların iskelet kasları üzerinde melatoninin antioksidan koruyucu etkisini histolojik ve biyokimyasal olarak araştırmışlardır. Sonuç olarak melotoninin koruyucu etkisini vurgulamışlardır.

Vural vd. (2013), 12 hafta boyunca Wistar albino sıçanlara CCl_4 ile beraber melatonin uygulamış ve 12 haftanın sonunda soleus kaslarını almış histolojik olarak incelemişlerdir. Sonuç olarak CCl_4 verilen grupla kıyaslandığında doku bütünlüğünün korunduğu, kan damarı etrafında kollajen liflerde azalma gözlemlenmiştir. Araştıcılar melatoninin hasarı durdurucu hatta koruyucu etkisini vurgulamışlardır. Benzer olarak bizim çalışmamızda ise melatonin verilen grupta kollajen liflerde azalma, doku

bütünlüğü kontrol grubuna yakın olarak gözlemlenmiştir. Kas fibrillerinde oluşan erimelerde azalmayla beraber normale yakın bir görünüm izlenmiştir.

Omurgalıların iskelet kas fibrilleri morfolojik, histokimyasal ve fonksiyonel durumları esas alındığında üç tiptir, kırmızı, beyaz ve ara fibriller (Lawrie 1953.a.b). Kırmızı fibriller, tip I ve yavaş oksidatif olarak tanımlanmıştır, beyaz fibriller ise tip IIB ve hızlı glikolitik, ara fibriller de tip IIA ve hızlı oksidatif olarak isimlendirlmiştir (Brooke ve Kaiser 1970). Tip I (kırmızı kas), kasa pembe rengi veren miyogloblin taşır. Tip I kası kasılırken hızı saniyede 17 mm kadardır, tip II nin ise saniyede 42 mm kadardır (Noyan, 1989). Tip I de kan damarları tip II den daha çoktur ve daha uzun süre aktivite gösterir. Tip II den daha incedirler ve bol miktarda mitokondri taşırlar. Tip II fibriller ise hızlı kasılırlar, diğerine göre daha büyük çapa sahiptirler fakat çabuk yorulurlar. Tip II lerin glikolitik enzimleri daha fazladır ve bol miktarda glikojen taşırlar.Tip II fibrillerde oksidatif metabolizma ikincil önemde olduğundan daha az sayıda mitokondri bulundurur. Tip I fibriller ise yüksek düzeydeki oksidatif metabolizmayı desteklemek için çok sayıda mitokondri bulundurur (Guyton ve Hall 1966). Soleus yavaş kasılan lifleri içermekte olup, gastrocnemius ise yavaş ve hızlı kasılan liflerinin ikisini de içermektedir (Suwa vd.1998). Vural vd. (2013) soleus kasına CCl_4'ün etkisini çalışmışlardır. Bilindiği gibisoleus yavaş kasılan bir kastır. Bu çalışmayla karşılaştırılacak olursak gastrocnemius kasının soleus kasına göre CCl_4'den daha fazla etkilendiğini söyleyebiliriz. Dolayısıyla melatoninin soleusta iyileştirme etkisinin gastrocnemiusa göre daha fazla olduğu söylenebilir.

Çiftçi ve Yüce (2013) ratlarda yaptıkları çalışmada CCl_4 vererek karaciğerde fibrozis oluşturmuş bununla beraber koroner damara verdiği hasarı incelemişerdir. Çalışmalarındaki damarların patolojik bulguları incelendiklerinde CCl_4 verilen gruba ait hayvanlarda koroner damarların musküler katmanında fibrinoid dejenerasyon ile birlikte kas hücrelerinde vakuoler dejenerasyon tespit edildiği, ayrıca belirgin perivasküler bağ doku artışının şekillendiği gözlemişlerdir. Aynı koroner arterlerin intima tabakasındaki endotel hücrelerinin bulanık şişme nedeniyle bazal membranda ayrılmaların olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada ise kontrol gruplarında kan damarları çeperleri ve etrafındaki bağ doku normal düzeydedir. CCl_4 uygulanmış grupta ise periovasküler

bağdoku artışı ile beraber vakuoler dejenerasyonayrıca anjiyogenezis tespit edildi. Melatonin uygulanmış grupta ise periovasküler bağ doku kontrol grubuna yakın bulundu. Damar çeperinde erime ve vakuoler dejenerasyona rastlandı. Melatoninin damar çeperinde iyileştirici etkisinin çok fazla olmadığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışmada kronik olarak CCl_4 uygulandığında gastrocnemius kasında fibrozis oluşturduğu tespit edilmiştir. Fibrozise ilaveten kasın morfolojik karakterinde bozulmalar, fibrillerde yer yer erime ve kontraktil protein kaybı gözlenmiştir. CCl_4'ün vasküoler sisteme etkisinin fazla olduğu söylenebilir. Özellikle kan damarları etrafında kollajen lifte artış ve kan damarlarında dejenerasyongörülmüştür. Melatoninin antioksidan özelliği sayesinde fibroziste azalma, kas fibrillerinde iyileşmenin olduğu ve kas hücrelerinde bütünlük sağlandığı gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, CCl_4 ile deneysel olarak oluşturulan kas hasarına karşı melatonin iyileştirici etkisi olduğu söylenebilir. Fakat melatoninin damar çeperine iyileştirici etkisinin çok fazla olduğu söylenemez.

KAYNAKLAR

Abraham, P., Wilfred, G. and Cathrine, S.P. 1999. Oxidative damage to the lipids and proteins pf the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 289; 177-179.

Adams, H.R. Veterinary Pharmacology and Therapeuties. 7th Edition. Iowa State University Press/AMES, 1995.

Ahmad, F. F., Cowan, D. L. and Sun, A.Y. 1987. Detection of free radical formation in various tissues after acute carbon tetrachloride administration in gerbil. Life sciences, 41(22); 2469-2475.

Ahmed, S., Rahman, A., Alam, A., Saleem, M., Athar, M. and Sultana, S. 2000. Evaluation of the Efficacy of *Lawsonia alba* in the Alleviation of Carbon Tetrachloride- Induced Oxidative Stress. Journal of Ethnopharmacology, 69; 157-164.

Akkuş, İ. 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya.

Altun, A., Vardar, A. and Altun, B. U. 2001. Melatonin ve Kardiyovasküler Sistem. The Anatolian journal of cardiology,1; 283-288.

Antolin, I.,Rodriguez, C., Sainz, R. M., Mayo, J. C.,Uría, H., Kotler, M. L., Rodríguez-Colunga, M. J.,Tolivia, D. and Menéndez-Peláez, A. 1996. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. Federation of American Societies for Experimental Biology journal, 10; 882-890.

Arendt, J. Melatonin. 1988. Clinical endocrinology, 29; 205-209.

Arendt, J. 1995. The Pineal Gland: Basic Physiology and Clinical Implications. In: DeGROOT LJ, eds. Endocrinology. 3rd. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 433-42.

Arendt, J., Skene, D. J. 2005. Melatonin as a chronobiotic. Sleep medicine reviews, 9; 25-39.

Arosıo, B., Gaglıano, N., and Annonı, G. 2000. Aloe- Emodin Quinone Pretreatment Reduces Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride. Pharmacology & Toxicology, 87; 229-233.

Balsam, L. B., Wagers, A. J., Christensen, J. L., Kofidis, T., Weissman, I. L., and Robbins, R. C. 2004. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. Nature 428; 668-673.

Barlow-Walden, L. R., Reiter, R. J.,Abe, M,Pablos, M.,Menendez-Pelaez, A., Chen, L. D., and Poeggeler, B. 1995. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. Neurochemistry international, 26; 497-502.

Basu, S. 2003. Carbon tetrachloride induced lipid peroxidation : eicosanoid Formation and their regulation by antioxidant nutrients. Toxicology, 189(1-2); 113-127.

Beyer, C. E., Steketee, J. D., and Saphier, D. 1998. Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery. Biochemical pharmacology, 56; 1265-1272.

Bischoff, R. 1994 in Myology (Engel, A. G., and Franzini-Armstrong, C., eds) 2nd Ed., pp. 97–118, McGraw-Hill, New York

Brooke, M. H., and Kaiser , K. K. 1970. Three ‘’ myosin adenosine triphosphatase’’ system: the nature of their pH liability and sulfhydryl dependence. Journal of histochemistry & cytochemistry, 18; 670-2.

Brzezinski, A. 1997. Melatonin in humans. The New England journal of medicine, 336; 186-95.

Burton, G. W. 1994. Vitamin E: Molecular and biological function. Proceedings of The Nutrition Society, 53(2); 251-262.

Campino, C., Valenzuela, F., Arteaga, E., Torres-Farfán, C., Trucco, C., Velasco, A., Guzmán, S., and Serón-Ferré, M. 2008. Melatonin reduces cortisol response to ACTH in humans. Revista médica de Chile, 136; 1390-1397.

Claustrat, B., Brun, J., Geoffriau, M., and Chazot, G. 1998. Melatonin: from the hormone to the drug? Restorative neurology and neuroscience, 12; 151-157.

Coto-Montes, A.,Tomas-Zapico, C., Escames, G., León, J.,Tolivia, D.,JosefaRodríguez-Colunga, M.,and Acuña-Castroviejo, D. 2003. Characterization of melatonin high-affinity binding sites in purified cell nuclei of the hamster (Mesocricetus auratus) Harderian gland. Journal of pineal research, 34; 202-207.

Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A.,Ames, B. N.,Saul, R. L.,McCord, J. M., and Harman, D.1987. Oxygen radicals and human disease. Annals of internal medicine, 107; 526-545.

Çam, A., and Erdoğan M. F. Melatonin. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 56, Sayı 2, 2003; 103-112.

Çınar, A., Yörük, M., Meral, İ.,Kalp,D.,Koç, A.,and Ertekin A. 1999. Karbon tetraklorür (CCl4) ile tavşanlarda deneysel olarak oluşturulan akut ve kronik intoksikasyonun karaciğerin histolojik yapısına, bazı hematolojik değerlere ve elektrokardiyogram üzerine etkileri. Turkısh Journal of Veterınary and Anımal Scıences, 23; 235-242.

Çiftçi, R., ve Yüce, A. 2013. Karaciğer Fibrozisli Ratlarda Kuersetinin Homosistein Düzeyi ve Koroner Damar Hasarı Üzerine Etkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi,27(3); 159 -167.

Dubocovich, M. L., Masana, M. I., Iacob, S., and Sauri, D. M. 1997. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 355; 365-375.

Dubovich, M. L. 1995. Melatonin receptors: Are there multiple subtypes? Trends in pharmacological sciences, 16; 50-56.

Dursun, N. Veneriner Anatomi I. Metisan yayınevi. Ankara. 2006. 10. Baskı. 276 s.

Ercan, N., and Fidancı, U. R. 2012. Piyodermalı köpeklerde idrarda 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 59; 163-168.

Erdem, M., Bostan, B., Güneş, T., Özkan, F., Şen, C., Özyurt, H., Köseoğlu, R. D., and Erdoğan, H. 2010. Melatonin iskelet kası iskemi- reperfüzyon yaralanması üzerine koruyucu etkisi.Jaint Diseases and Related Surgery, 21(3); 166-171.

Erlich, S. S., and Apuzzo, M. L. J. 1985. The pineal gland: anatomy, physiology and clinical significance. Journal of Neurosurgery, 63; 321-341.

Farombi, E. O. 2000. Mechanism for the hepatoprotective action of kolaviron: studies on hepatic enzymes, microsomal lipids and lipid peroxidation in carbontetrachloride- treated rats. Pharmacological research, 42(1); 75-80.

Fourtillan, J. B., Brisson, A. M., Fourtillan, M., Ingrand, I., Decourt, J. P., and Girault, J. 2001. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 280; E11-E22.

Freeman, B. A.,and Crapo, J. D. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 47(5); 412-426.

Guardiola-Lemaitre, B. 2007. Melatoninergic receptor agonists and antagonists: therapeutic perspectives. Journal de la Société de biologie, 201; 105-113.

Guerrero, J. M., and Reiter, R. J. 1992. A brief survey of pineal glandimmune system interrelationships. Endocrine research, 18; 91-113.

Guyton, A.C., Hall, J.E. 1966. Textbook of Medical physiology. 9. Ed. Ed. W. B. Saunders. London.

Güneş, H. V. Moleküler Hücre Biyolojisi, Kaan Kitapevi, 1. Baskı, 40-41, 2003.

Hardeland, R., Pandi-Perumal, S. R ., and Cardinali DP. 2006. Melatonin. The international journal of biochemistry & cell biology, 38; 313-316.

Helper, J.P. 1992. G proteins. Trends in biochemical sciences, 383-87.

http://www.fluoridealert.org/wp-content/pesticides/sodium.f.pineal.htm

Huard, J., Li, Y., and Fu, F. H. 2002. The Journal of Bone Joint Surgery, 84; 822-832.

Jahovic, N., Cevik, H., Sehirli, A.O., Yeğen, B. C., and Sener, G. 2003. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. Journal of pineal research, 34; 282-287.

Kääriäinen, M., Järvinen, T., Järvinen, M., Rantanen, J., and Kalimo, H. 2000.Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports, 10;332-337.

Kaneko, T., Wang, P. Y., and Sato, A. 2000. Relationship between blood/air partition coefficients of lipophilic organic solvent and blood triglyceride levels. Toxicology, 143; 203-208.

Karadeniz, A., Yıldırım, A., and Çelebi, F. 2007. Protective effect of Panax ginseng against carbon tetrachloride (CCl4)-induced oxidative brain injury in rats. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimler Dergisi, 2; 117-121.

Karadeniz, A., Yıldırım , A., Karakoç, A., Kalkan, Y., and Çelebi, F. 2009. Protective effect of Panax ginseng on carbon tetrachloride induced liver , heart and kidney injury in rats. Revue de médecine vétérinaire, 160; 237-243.

Kayaalp, O. 2002. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10. Baskı, Hacettepe Taş.

Konturek, S. J., Konturek, P. C., Brzozowska, I., Pawlik, M., Sliwowski, Z., Cześnikiewicz-Guzik, M., Kwiecień, S., Brzozowski, T., Bubenik, G. A., and Pawlik, W. W. 2007. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society, 58: 381-405.

Korkmaz, A., Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C. 2011. Melatonin; from pineal gland to healthy foods. Spatula DD, 1(1): 33-36.

Kuş, I., Çolakoğlu, N., Pekmez, H., Seçkin, D., Öğeturk, M., and Sarsılmaz, M. 2004. Protective effects of caffeic acid phenethly ester (CAPE) on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats, Acta Histochemica 106; 289-297.

Kuş, İ., and Sarsılmaz, M. 2002. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 22; 221-226.

Lawrie, R. A. 1953a. The activity of the cytochrome system in muscle and its relation to myoglobin. The Biochemical journal, 55(2); 298-305.

Lawrie, R. A. 1953b. The relation of energy-rich phosphate in muscle to myoglobin and to cytochrome-oxidase activity. The Biochemical journal, 55(2); 305-309.

Lee, M. K., Yeo, H., Kım, J., Kım Y. C. 2000. Protection of rat hepatocytes exposed to CCl4 ın-vıtro by Cynandione A, a Biacetophenone from *Cynanchum wilfordii*. The Journal of pharmacy and pharmacology, 52(3); 341-345.

Leon, O.S., Menendez, S., Merino, N., Castillo, R., Sam, S., Perez, L., Cruz, E., and Bocci, V. 1998. Ozone Oxidative Precontioning a Protection Cellular Damage by Free Radicals. Mediators ofİmflammation, 7; 289.

Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., and Mori, W. 1958. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. Journal of the American Chemical Society, 80; 2587.

Li, ZB.,Kollias, H. D.,and Wagner, K. R. 2008. Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. The Journal of biological chemistry, 283(28):19371-19378.

Liebmann, P. M., Wölfler, A., Felsner, P., Hofer, D., and Schauenstein, K. 1997. Melatonin and the immune system. International archives of allergy and immunology, 112; 203-211.

Maestroni, G. J. M., Conti, A., and Pierpaoli, W. 1987. The Pineal Gland and the Circadian, Opiatergic, Immunoregulatory Role of Melatonin. Annals of the New York Academy of Sciences, 496; 67-77.

Maestroni, G. J. M. 1995. T-Helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. Journal of pineal research, 18; 84-89.

Maestroni, G. J., and Conti, A. 1991. Antistress role of melatonin in immüno-opioid network. The International journal of neuroscience, 61 (3-4); 289-298.

Maestroni, G. J., Conti, A., and Lissoni, P. 1994. Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4. Cancer research, 54; 4740-4743.

Maianskii, D. N., and Kutina, S. N. 1979. Characteristics of the development of acute hepatitis in rats stimulated with prodigiozan. Biulleten' eksperimental'noĭ biologii i meditsiny, 87; 622-624.

Mansour, M. A. 2000. Protective Effects of Thymoquinone and desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice. Life Sciences, 66(26); 2583-2591.

Mayo, J. C.,Sainz, R. M., Antolin, I., Herrera, F.,Martin, V., and Rodriguez, C. 2002. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. Cellular and molecular life sciences, 59; 1706-1713.

Millet, B., Touitou, Y., Poirier, M. F., Bourdel, M. C., Amado, I., Hantouche, E. G., Bogdan, A., and Olié, J. P. 1999. Obsessive-compulsive disorder: evaluation of clinical and biological circadian parameters during fluoxetine treatment. Psychopharmacology, 146; 268-274.

Miyazaki, T.,Matsuzaki, Y.,Ikegami, T.,Miyakawa, S.,Doy, M.,Tanaka, N., andBouscarel, B. 2004. The harmful effect of exercise on reducing taurine concentration in the tissues of rats treated with CCl4 administration. Journal of gastroenterology, 39(6):557-62.

Muralı, B., Korrapatı, M.C., Warbrıtton, A., and Latendresse, J.R. 2004. Mehendale Tolerance of aged Fischer 344 rats against chlordecone-amplified carbon tetrachloride toxicity. Mechanisms of ageing development, 125; 421-435.

Muriel, P., Alba, N., Perez-Alvarez, V. M., Shibayama, M., and Tsutsumi, V. K. 2001. Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride. Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP, 130(2); 219-226.

Murray, R. K., Mayes, P. A., Granner, D. K., and Rodwell, V. W. 1993. Harper'ın Biyokimyası. Barış Kitapevi.

Noyan, A. 1989. Kas fizyolojisi. Fizyoloji. 6. Baskı 384-419.

Ogeturk, M., Kus, I., Kavakli, A., Oner, J., Kukner, A., and Sarsilmaz, M. 2005. Reduction of carbon tetrachloride-induced nephropathy by melatonin administration. Cell biochemistry and function, 23; 85-92.

Ogeturk, M., Kus, I., Colakoglu, N., Zararsiz, I., Ilhan, N., and Sarsilmaz, M. 2005. Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. Journal of Ethnopharmacol, 97; 273-280.

Oztürk, F., Ucar, M., Ozturk, I. C., Vardi, N., and Batcioglu, K. 2003. Carbon tetrachloride induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats. Urology, 62(2); 353-356.

Pablos, M. I.,Reiter, R. J.,Ortiz, G. G.,Guerrero, J. M.,Agapito, M. T.,Chuang, J. I.,and Sewerynek, E. 1998. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. Neurochemistry international, 32; 69-75.

Penev, P. D., and Zee PC. 1997. Melatonin: a clinical perspective. Annals of neurology, 42; 545-553.

Pope , A. M., Rall, D. P. 1995. Enviromental Medicine: Integrating a Missing Element in to

Medical Education, Case Study 8: Carbon Tetrachloride, U.S. National Academy Press, pp. 249-266.

Pope, A.M. and Rall, D. P. Institute of Medicine. (Eds.) (1995) Environmental Medicine. National Academy Press, Washington D.C. USA

Raymond J. R. 1994. Hereditary and Acquired Defects in Signaling Through the Hormonereceptor-G protein Complex. The American journal of physiology, 163-174.

Reiter, R. J. 1991. Melatonin. The chemical expression of darkness. Molecular and cellular endocrinology, 79; 153-158.

Reiter, R. J. 1991. Neuroendocrine effects of light. International journal of biometeorology,35; 169-175.

Reiter, R. J. 2002. Potential biological consequences of excessive light exposure: melatonin suppression, DNA damage, cancer and neurodegenerative diseases. Neuro endocrinology letters, 23 Suppl 2; 9-13.

Reiter, R. J., and Maestroni, J. M. 1999. Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation. Journal of molecular medicine; official organ of the "Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte", 77; 36-39.

Reiter, R. J., Calvo, J. R., Karbownik, M., QI, W., and Tan, D. X. 2000. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. Annals of the New York Academy of Sciences, 917; 376-386.

Reiter, R. J., Carneiro, R. C., and Oh, C. S. 1997. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. Hormone and metabolic research, 29; 363-372.

Reiter, R. J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow- Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G. G., and Acuña-Castroviejo, D. A. 1995. Review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. Journal of pineal research, 19: 149-165,

Reiter, R. J., Tan, D. X., Qi, W., Manchester, L. C., Karbownik, M., and Calvo, J. R. 2009. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. Biological signals and receptors, 9; 160-171.

Reiter, R. J.,Paredes, S. D.,Manchester, L. C.,and Tan, D. X. 2009. Reducing oxidative/ nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 44; 175-200.

Reppert, S. M., Weaver, D. R., and Godson C. 1996. Melatonin receptors step in to the light: Cloning and classification of subtypes. Trends in pharmacological sciences,17; 100-102.

Serbetçi, K.,Uysal, O.,Erkasap, N.,Köken, T.,Baydemir, C., andErkasap, S. 2012. Anti-apoptotic and antioxidant effect of leptin on CCl_4-induced acute liver injury in rats. Molecular biology reports, 39(2); 1173-80.

Sheweita, S. A., Abd, El-Gabar M., and Bastaway, M. 2001. Carbon Tetrachloride Changes the Activity of Cytochrome p450 System in the Liver of Male Rats: Role of Antioxidants.Toxicology , 169; 83-92.

Song, Y., Chan, C. W., Brown, G. M., Pang, S. F., and Silverman, M. 1997. Studies of the renal action of melatonin: Evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of the Mel1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule. Federation of American Societies for Experimental Biology journal, 11; 93-100.

Srinivasan, M., Rukkumani, A., Sudheer, R., and Menon, V. P. 2005. Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachloride induced toxicity. Fundamental & clinical pharmacology, 19; 491-496.

Sugden, D., and Chong, N. W. S. 1991. Pharmacological identity of 2-(125-I) iodomelatonin binding sites in chicken brain and sheep pars tuberalis. Brain research, 539; 151-4.

Suwa, M., Miyazaki, T., Nakamura, T., Sasaki, S., Ohmori, H., and Katsuta, S. 1998. Hereditary dominance of fast-twitch fibers in skeletal muscles and relation of thyroid hormone under physiological conditions in Rats. Acta anatomica,162; 40-5.

Szymonik-Lesiuk, S., Czechowska, G., Stryjecka-Zimmer, M., Slomka, M., Madro, A., Celinski, K., and Wielosz, M. 2003. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery, 10; 309-315.

Şener, G. 2010. Karanlığın hormonu melatonin. Marmara Eczacılık Dergisi 14; 112-120.

Taniguchi, M., Takeuchi, T., Nakatsuka, R., Watanabbe, T., and Sato, K. 2004. Molecular process in acute liver injury and regeneration induced by carbon tetrachloride. Life Sciences, 75; 1539-1549.

Tirkey, N., Pilkhwal, S., Kuhad, A., and Chopra, K. 2005. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stres produced by carbontetrachloride in rat liver and kidney. BioMed Central pharmacology & toxicology, 5; 2.

Valko , M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions, 160; 1-40.

Vural, F., Ozerkan, D., Cebesoy., Ozsoy, N., and Elmubarak, S. 2013. Karbontetraklorür uygulanmış sıçan soleus kası üzerine melatoninin etkisi. 1. Zooloji Kongresi 28-31 Ağustos, Nevşehir Üniversitesi, Bildiri Özetleri Kitabı, 37, Nevşehir.

Waldhauser, F., Frisch, H., Waldhauser, M., Weiszenbacher, G., Zeitlhuber, U., and Wurtman, R. 1984. Fall in nocturnal serum melatonin during prepuberty and pubescence. Lancet, 1; 362- 365.

Wichmann, M. W., Zelleneger, R., DeMaso, C. M., Ayala, A., and Chaudry, I. H. 1996. Melatonin administration attenuates depressed immune functions after trauma-hemorrhage. The Journal of surgical research, 63; 256-262.

Yamomoto, H., Yamomoto K., Kume, M., Kımoto, S., Toyokunı S., Uchıda, K., and Fukomoto, M. 2000. Heat shock preconditioning reduces oxidative protein denaturation and ameliorates liver injury by carbon tetrachloride in rats. Research in experimental medicine, 199; 309-318.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Duygu Fevziye VURAL

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Tarihi : 28/05/1987

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Mobil Lisesi (2004)

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstütüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Yayınlar

1. Vural F., Cebesoy, S., Karakaş, M. (2013) ‘’Classification of Cell Death’’ Journal of Entomology and zooloji studies,1 (5); 22-28.

Uluslararası Kongreler

Fevziye VURAL, Suna Cebesoy, Mehmet Karakaş.” Classification of Cell Death” 3. Uluslararası Moleküler Biyoloji Ve Biyoteknoloji Kongresi , 2-6 Haziran 2014 Saraybosna

Ulusal Kongre Sunum

1. Fevziye VURAL, Dilşad ÖZERKAN, Suna CEBESOY, Nesrin ÖZSOY, Safa mohammed Elmustafa Osman ELMUBARAK ’’Karbontetraklorür Uygulanmış Sıçan Soleus Kası Üzerine Melatoninin Etkisi’ (2013) (1. Zooloji Kongresi) (Sözlü Sunum)

2. Dilşad ÖZERKAN, **Fevziye VURAL**, Suna CEBESOY, Nesrin ÖZSOY, Safa mohammed Elmustafa Osman ELMUBARAK ‘’Deneysel Karbontetraklorür Toksisitesinde Soleus Kas Hasarı ve D Vitaminin Rolü’’ (2013) (1. Zooloji Kongresi)(Sözlü Sunum)