



Melatoninin iskelet kası iskemi-reperfüzyon yaralanması üzerine koruyucu etkisi

Protective effects of melatonin on ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle

Mehmet Erdem,¹ Bora Bostan,¹ Taner Güneř,¹ Fatih Özkan,² Cengiz řen,¹ Hüseyin Özyurt,³ Reřit Doęan Köseoęlu,⁴ Hasan Erdoęan⁵

Gaziosmanpařa Üniversitesi Tıp Fakóltesi ¹Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı,

²Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, ³Biyokimya Anabilim Dalı, ⁴Patoloji Anabilim Dalı,

⁵Fizyoloji Anabilim Dalı, Tokat, Türkiye

Amaç: Bu çalışmada, akut iskemi/reperfüzyon (İ/R) yaralanması oluşturulan Wistar albino türü sıçanların iskelet kasları üzerinde melatoninin antioksidan koruyucu etkisi araştırıldı.

Gereç ve yöntemler: Bu deneysel çalışmaya ağırlıkları 334-422 g arasında olan 28 erkek Wistar albino türü sıçan alındı. Sıçanlar, randomize olarak sırasıyla, kontrol, İ/R ve İ/R + melatonin olmak üzere üç gruba ayrıldı. Ekstremitte iskemisi, femoral artere klemp konarak sağlandı. İki saat iskemi süresini takiben 1.5 saat süren reperfüzyon sonrasında, biyokimyasal analiz ve histopatolojik inceleme için kas örnekleri alındı.

Bulgular: İskemi/reperfüzyon grubunun kas doku örneklerinde antioksidan enzim (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz) aktiviteleri, malondialdehit, nitrik oksit düzeyleri ve protein karbonil içeriği kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$). Kas dokusundaki bu parametre seviyeleri karşılaştırıldığında, İ/R + melatonin grubunda, İ/R grubuna göre belirgin azalmalar tespit edildi ($p<0.001$). İskemik kasların histopatolojik incelemesinde, kontrol grubu ile kıyaslandığında, İ/R grubunda belirgin bir dejenerasyon ve inflamasyon gözlemlendi, oysa, İ/R grubu ile karşılaştırıldığında, melatonin verilen iskemik kaslarda dejenerasyon ve inflamasyonda önemli bir azalma gözlemlendi ($p<0.001$).

Sonuç: Bu iskelet kası akut İ/R yaralanması modelinde; melatoninin, iskelet kası reperfüzyon yaralanmasına karşı koruyucu etkisi vurgulandı. Akut vasküler yaralanmalı ekstremitte travmaları, uzamış turnike süreli ekstremitte cerrahisi ve akut kompartman sendromu gibi olgularda serbest radikallerin doku hasarını azaltmak için, melatoninin koruyucu etkisinin klinik çalışmalarla araştırılmasını öneriyoruz.

Anahtar sözcükler: İskemi/reperfüzyon yaralanması; melatonin; reaktif oksijen ürünleri; iskelet kası.

Objectives: In this study, we investigated the antioxidant protective effects of melatonin on skeletal muscles of Wistar albino-type rats with acute ischemia/reperfusion (I/R) injury.

Materials and methods: Twenty-eight Wistar albino-type male rats weighing between 334 to 422 g were included in this experimental study. The rats were randomly allocated into three groups including sham, I/R and I/R + melatonin groups, respectively. Limb ischemia was achieved by clamping femoral arteries. After a two-hour ischemia period followed by 1.5-hour reperfusion, muscle samples were collected for biochemical analysis and histopathological examination.

Results: Muscle tissues of I/R groups revealed significantly higher antioxidant enzyme (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase) activities, and increased levels of malondialdehyde, nitric oxide, and protein carbonyl content compared to the control group ($p<0.001$). Levels of these parameters in muscle revealed significant reductions in the I/R + melatonin group compared to the I/R group ($p<0.001$). Histopathological examination of ischemic muscles in the I/R group showed significant degeneration and inflammation compared to the control group whereas melatonin administered ischemic muscles showed significant reduction in degeneration and inflammation compared to the I/R group ($p<0.001$).

Conclusion: In the present skeletal muscle acute I/R injury model, protective effects of melatonin against reperfusion injury have been revealed. We suggest that the protective effect of melatonin against I/R damage in cases of extremity injuries with acute vascular compromise, extremity surgery with prolonged tourniquet time and acute compartment syndrome should be investigated with clinical trials.

Key words: Ischemia/reperfusion injury; melatonin; reactive oxygen species; skeletal muscle.

Damar yaralanmalı kırıklar, kompartman sendromu ve turnike süresinin uzadığı cerrahi girişimler, ekstremiteleri iskemiyeye maruz bırakabilmektedir. Ekstremitenin iskemik dokularının oksijenize kanla reperfüzyona maruz kalması; hidroksil ($\cdot\text{OH}$), süperoksit anyon ($\text{O}_2\cdot$), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$) gibi serbest radikalleri içeren reaktif oksijen ürünleri (ROÜ)'nin aşırı üretimine ve bunların kan dolaşımına katılmasına neden olur. Bu ROÜ'ler; uzamış iskemik ekstremitelerde, hücre hasarına yol açabilmektedir.^[1,2] Ancak organizma, serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarını önlemek için bir antioksidan savunma sistemi geliştirir. Antioksidan savunma sistemi; serbest radikaller ve ilgili ürünlere dolaylı yoldan etki eden "antioksidan enzimler" ve doğrudan etki eden "melatonin gibi düşük ağırlıklı moleküllerden" oluşmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) antioksidan enzim sistemleri olup, dolaylı yolun temel "serbest radikal süpürücü (scavenger)"leridir.^[3] Vücutta, serbest radikaller (oksidan maddeler) ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge vardır ve bu dengenin oksidanların lehine bozulması durumuna, 'oksidatif stres' denir.^[4,5]

Pineal bezden salgılanan ana ürün olan melatoninin; sirkadiyen ve mevsimsel ritim, retinal fizyoloji, immün ve üreme fonksiyonları üzerinde etkileri vardır.^[5-7] Ayrıca, melatoninin, birçok farklı doku iskem/reperfüzyon (İ/R) modellerinde serbest radikal süpürücü etkiye sahip olduğu, ortaya konulmuştur.^[5,6,8-12]

Bu çalışmanın amacı, sıçan iskelet kasında oluşturulan akut İ/R yaralanma modelinde oluşturulan oksidatif stres durumunda melatoninin antioksidan etkisini araştırmaktır. Bu amaçla akut İ/R sonrası kas dokusunda; çeşitli oksidatif stres belirteçleri olan malondialdehit (MDA), $\text{NO}\cdot$ düzeyleri ve doku protein karbonil (PC) içeriği; SOD, GST-Px ve CAT enzim aktiviteleri ölçüldü ve kas dokusunda histopatolojik inceleme yapıldı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu deneysel çalışma, hastanemiz Yerel Etik Komite'si tarafından onaylanmasını takiben, ağırlıkları 334-422 g arasında olan 28 erkek Wistar albino türü sıçanlar ile gerçekleştirildi. Sıçanlar kontrol (n=8), İ/R (n=10), ve İ/R + melatonin (n=10) grupları olarak rastgele üç gruba ayrıldı.

Tüm cerrahi işlemler, intraperitoneal verilen ketamin (60 mg/kg^{-1}) ve ksilazin (10 mg/kg^{-1}) kokteyl ile oluşturulan anestezi altında gerçekleştirildi. Kontrol grubu hariç diğer gruplarda sağ arka bacakta femoral artere klemp konularak iskemiy oluşturuldu. Melatonin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), İ/R + melatonin grubundaki sıçanlara reperfüzyondan 48, 24 ve bir saat önce 10 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak verildi. İki saat iskemiy ve 1.5 saat reperfüzyondan sonra sağ tibialis anterior kas dokusu; SOD, GSH-Px ve CAT antioksidan enzim aktiviteleri; MDA ve $\text{NO}\cdot$ seviyeleri, PC içeriği biyokimyasal analizleri ve gastrokneki kası ise histopatolojik inceleme için alındı.

Biyokimyasal analiz

Biyokimyasal analiz için sıçanlar dekapite edildi ve çıkarılan iskelet kasları analize kadar $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 'de bekletildi. Tartı sonrası iskelet kasları 0.50 ml l^{-1} Triton x-100 içeren beş birim buzlu tris-hidrojen klorid (Hcl) tamponunda (50 mM , $\text{pH}=7.4$) $4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de ve 13.000 rpm hızda iki dakika homojenize (Homojenizer-IKA Ultra-Turrax t 25 Basic, Staufen, Germany) edildi. Bütün işlemler $4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirildi. Homojenat, süpernatant ve alınan örnekler hazırlandı, daha sonra Sigma tarafından sağlanan kimyasallarla protein^[13] ve biyokimyasal parametrelerle birlikte analizler yapıldı.

Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Sun ve ark.nın yöntemi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanır.^[14] Oluşan renkli formazonun absorbanansı 560 nm 'de ölçülerek enzim aktivitesi tayin edilir. Süperoksit dismutaz aktivitesi "U/mg protein" olarak tanımlandı.

Glutatyon peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Paglia ve Valentine^[15] yöntemine göre; GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte glutatyonun okside glutatyonu yükseltgenmesini katalizler. Bu reaksiyonda kullanılan NADPH'nin NADP'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbanans azalmasının 340 nm 'de ölçülmesi ile enzim aktivitesi hesaplanır. Enzim aktivitesi, U/g protein cinsinden tanımlandı.

Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Aebi yöntemine göre, deney ortamına ilave edilen hidrojen peroksit, katalaz tarafından su ve

TABLO I

Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz seviyeleri

	Kontrol	İ/R	İ/R + melatonin	p
	Ort.±SS	Ort.±SS	Ort.±SS	
SOD (U/mg protein)	0.076±0.004	0.151±0.018	0.103±0.006	0.001
GSH-Px (U/g protein)	1.010±0.112	2.037±0.266	1.067±0.106	0.001
CAT (k/g protein)	0.061±0.005	0.150±0.008	0.091±0.005	0.001
NO (μmol/g yaş doku)	0.342±0.018	0.645±0.055	0.420±0.015	0.001
MDA (nmol/g yaş doku)	1.397±0.058	2.627±0.271	1.763±0.108	0.001
PC (nmol/μg protein)	0.953±0.084	1.962±0.247	1.120±0.078	0.001

İ/R grubunda kontrol grubuna göre belirgin artış ve İ/R + melatonin grubunda, İ/R grubuna göre belirgin bir azalma vardır (p<0.001). MDA, NO, düzeyleri ve doku PC içeriği; İ/R: İskemi/reperfüzyon; SOD: Süperoksit dismutaz; CAT: Katalaz; GSH-Px: Glutatyon peroksidaz; MDA: Malondialdehit; NO: Nitrik oksit; PC: Protein karbonil.

oksijene parçalanır, bu sıradaki absorpsiyon azalması 240 nm'de ölçülerek enzim aktivitesi belirlenir.^[16] Sonuçlar "k/g protein" olarak belirlendi.

Malondialdehit seviyesinin belirlenmesi

Doku tiyobarbitürik asit ile 90-95 °C'de reaksiyona giren MDA ve diğer tiobarbitürik asit-reaktif madde (TBARS), pembe renkli kromojen oluşturur. On beş dakika sonra hızla soğutulan numunelerin absorpsiyonları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okunarak MDA düzeyleri ölçülür.^[17] Sonuçlar standart solüsyonla (1,1,3,3-tetrametoksipropan) yapılan ölçümlerden hazırlanan standart grafiğe göre "nmol/g yaş doku" cinsinden belirlendi.

Nitrik oksit seviyesinin belirlenmesi

Griess reaksiyonu ve modifiye cadmiyum reaksiyonu ile üretilen nitritsülfanilamid ve buna bağlı N-naftiletildiamin (NDA) diazotizasyonu ile reaksiyon sonucu oluşan rengin 545 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenir.^[18] Sonuçlar, "μmol/g yaş doku" cinsinden tanımlandı.

Doku protein karbonil içeriğinin belirlenmesi

Hidrojen klorid içerisinde hazırlanan 2,4-dinitrofenilhidrazin solüsyonunun karbonil içeriği ile reaksiyona girmesi sağlanarak, etanol/etil asetat karışımı ile üç defa yıkanan çökelti bir sonraki aşamada 100 mM NaOH çözeltisi içerisinde çözülükten sonra 360 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.^[19] Sonuçlar, "nmol/μg protein" cinsinden tanımlandı.

Histolojik değerlendirme

Işık mikroskopi ile inceleme için, iskelet kasları %10'luk formaline konduktan sonra parafine gömüldü. Doku kesitler (5 mikrometre) hematoksi-

len eozin (H-E) ile boyandıktan sonra ışık mikroskopi ile inceleme yapıldı. Histolojik hasarı değerlendirmede kas liflerinin organizasyon bozukluğu ve dejenerasyonuna (0: normal, 1: hafif, 2: orta, 3: ağır) ve enflamatuvar hücre infiltrasyonuna (0: normal, 1: hafif, 2: orta, 3: ağır) bakıldı.^[8]

İstatistiksel analiz

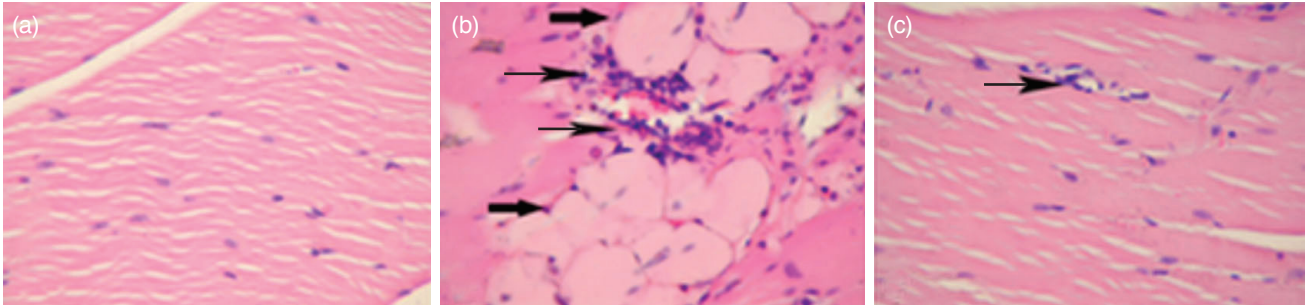
Biyokimyasal parametrelerde, grup dağılımları Kolmogorov-Smirnov one sample testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren gruplarda grupların karşılaştırılmasında, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) testi ve post hoc testlerden LSD (least-squares differences) testi kullanıldı.

Histopatolojik parametrelerin değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis analizi kullanıldı. İkişerli karşılaştırmalarda Mann-Whitney U-testi uygulanarak kritik p değeri <0.017 olarak hesaplandı.

İstatistiksel analizler "Statistical Package for Social Sciences" (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) Windows için 15.0 versiyon ile yapıldı. Değerler ortalama ± standart hata olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için, p<0.05 olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

İskemi/reperfüzyon grubunun kas dokusunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; SOD, GSH-Px ve CAT antioksidan enzim aktivitesi ile MDA, NO[•] seviyesi ve PC içeriği anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0.001; Tablo I). İskemi/reperfüzyon + melatonin grubunda; SOD, GSH-Px ve CAT antioksidan enzim aktiviteleri ve MDA, NO[•] seviyesi ve PC içeriği, İ/R grubu ile karşılaştırıldığında, belirgin olarak düşük bulundu (p<0.001; Tablo I). İskemik



Şekil 1. (a) Kontrol grubunda normal iskelet kası (H-E x 40). (b) İskemi/reperfüzyon grubunda iskelet kasına ait interstisyel alanda fokal polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu (ince ok) ve dejeneratif değişiklik gösteren kas iğcikleri (kalın ok), (H-E x 40). (c) İskemi/reperfüzyon ve melatonin grubunda iskelet kasına ait interstisyel alanda dejeneratif değişiklik göstermeyen birkaç fokal polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu (ince ok), (H-E x 40).

kas dokularının histopatolojik incelenmesinde; İ/R grubunda, belirgin bir kas dokusu enflamasyonu ve dejenerasyonu tespit edilirken; İ/R + melatonin grubunda, kas dokusundaki dejenerasyon ve enflamasyonda belirgin azalma tespit edildi ($p < 0.017$; Şekil 1a-c).

TARTIŞMA

İskelet kası iskemiye karşı diğer dokulardan daha dayanıklıdır. Ortopedik cerrahide, uzamış turnike süresi, arter yaralanmalı ekstremitte travması, rekonstrüktif mikrocerrahi, akut kompartman sendromu sık karşılaşılan iskemik durumlardandır.^[20-23] İskemik durumlarda temel amaç, erken reperfüzyonu sağlayarak kas nekrozunu önlemektir. Bununla birlikte, reperfüzyonun kendisi “reperfüzyon yaralanması” olarak adlandırılan patofizyolojik bir duruma yol açmaktadır.^[23] İskemi sonrası doku hasarı, çoğunlukla reperfüzyon sırasında oluşur.^[24] Reperfüzyon, iskemik dokularda nötrofillerin birikimine ve endotel hücrelerinde ksantin oksidaz aktivitesinin artmasına neden olur ki, bu olaylar, süperoksit anyon ($O_2^{\cdot -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikal ($\cdot OH$) olarak bilinen ROÜ’lerin hızlı bir şekilde üretimine yol açar. Bu serbest radikaller, İ/R modellerinde^[8,12,23,25] gösterildiği gibi iskelet kası, endotel ve diğer hücrelerde toksik etkiye sahiptir.^[23,24]

“Oksidatif stres” sırasında ortaya çıkan ROÜ’ler; kas fibrillerinin kasılma ve organizasyonunun bozulmasına, dejenerasyonuna, nekrozuna; vasküler endotel hücre şişmesine ve mikrovasküler geçirgenliğin artmasına yol açarak, hücresel proteinlerin salınımı ve bu proteinlerin damar dışına kaçışına neden olurlar.^[8,25,26] Ayrıca ROÜ’ler, hücre membran lipidlerindeki doymamış yağ asitlerini etkileyerek lipid peroksidasyonuna ve bunun sonu-

cunda hücre membran akışkanlıklarında bozulma ve yırtılmaya neden olmaktadır. Malondialdehit, hücre membranı lipidleri peroksidasyonunun bir ürünüdür ve bunun ölçümü, oluşan serbest radikal miktarının bir göstergesidir.^[26] Ayrıca, serbest radikaller, doku protein yapılarında da oksidasyona neden olurlar ve bu doku protein hasarı, PC ölçümü ile ortaya konulabilir. Nitrik oksit, kardiyovasküler, nöral ve immün sistem fonksiyonları üzerinde düzenleyici etkisi olan nispeten reaktif olmayan bir serbest radikaldır.^[6] Bizim deneysel çalışmamızda da diğer İ/R araştırmalarında olduğu gibi,^[8,25] iskelet kası reperfüzyon hasarının bir göstergesi olarak kas dokusunda MDA, PC ve NO^{\cdot} seviyelerinin arttığı gözlemlendi. Ayrıca, histopatolojik incelemede, kas dokusunda enflamasyon artışı ve dejenerasyon gözlenmesi; bu biyokimyasal sonuçları desteklemekte idi.

İskemi/reperfüzyon çalışmalarında, reperfüzyon sonrasında antioksidan enzim aktivitesinin düştüğü görülmüş ve bu durum, artan oksidatif stres nedeniyle bu enzimlerin kullanımının artmasına bağlanmıştır.^[11,12] Ancak yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak, Özyurt ve ark.nın^[25] yaptıkları iskelet kası İ/R çalışmasında ise reperfüzyon sonrası kas dokusunda SOD ve CAT antioksidan enzim aktiviteyi yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise reperfüzyon sonrası İ/R grubundaki kas dokularında SOD, GSH-Px ve CAT antioksidan enzimlerin aktivitesinde artış tespit edildi (Tablo I). İskemi/reperfüzyon grubunda reperfüzyon sonrası antioksidan enzimlerdeki bu artış; İ/R olayında aşırı üretilen ROÜ’lerin, antioksidan savunma sistemini uyararak ve antioksidan enzimler olarak bilinen CAT, SOD ve GSH-Px enzimlerin ekspresyonunda artışa neden olarak, antioksidan savunma sistemini güçlendirmektedir. Böylece,

reperfüzyon sonrası iskelet kasında oluşan yüksek miktardaki serbest radikalleri detoksifiye etmek için vücudun oluşturduğu kompensatuvar bir mekanizma ile daha fazla antioksidan enzim üretimi gerçekleşmektedir ve bu sonuç, Özyurt ve ark. nın^[25] iskelet kası İ/R çalışmasını desteklemektedir.

Melatonin ve metabolitlerinin direkt serbest radikal süpürücü özelliği vardır.^[6] Melatonin bu etkisini; hücre membranı, çekirdekiği ve sitozol gibi birçok hücrel kompartmanda, antioksidan etkisi ile ortaya koyar.^[6,27] Reperfüzyon sonrası serbest radikaller iskelet kası üzerinde olumsuz etkiler göstermeye başlar^[28] ve melatonin serbest radikal süpürücü etkisi ile bu hasarı belirgin derecede önler.^[8] Ayrıca, melatonin; iskelet kasındaki mikrovasküler yapıyı da, reperfüzyon yaralanmasına neden olan serbest radikallerden korumakta ve böylece iskelet kası doku hasarının azaltılmasında sinerjik bir etki göstermektedir.^[23] Bu çalışmada, MDA, PC ve NO^{*} gibi reperfüzyon hasarının göstergesi olan ROÜ seviyelerinin İ/R + melatonin grubunda, İ/R grubundan düşük bulunması, melatoninin serbest radikal süpürücü etkisini göstermektedir (Tablo I). Ayrıca yine İ/R + melatonin grubundaki kas dokusunun histopatolojik incelemesinde, enflamasyon ve dejenerasyonunun azalması, İ/R'nin kas dokusunda oluşturduğu reperfüzyon yaralanmasına karşı melatoninin koruyucu etkisini desteklemektedir.

Melatoninin bir diğer serbest radikal süpürücü etki mekanizması ise, vücuttaki antioksidan enzim sistemini uyararak gerçekleştirmesidir.^[4] Erkanlı ve ark.^[8] alt ekstremite İ/R modelinde, melatonin ile tedavi edilen reperfüze dokularda, GSH-Px antioksidan enzim seviyesinde artış tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Glutasyon peroksidaz antioksidan enzim seviyesindeki artışın nedeni olarak; melatonin verilen İ/R grupta, melatoninin serbest radikalleri doğrudan detoksifiye etkisine bağlı "oksidatif stres" in azalması ve melatoninin GSH-Px antioksidan enzim sisteminin sentezini direkt uarması gösterilmiştir. Farklı dokularda yapılan bazı İ/R çalışmalarında da benzer sonuçlar bildirilmiştir.^[11,12] Bu çalışmamızda ise, melatonin verilen grupta (İ/R + melatonin), SOD, GSH-Px ve CAT antioksidan enzim aktivitesinde, İ/R grubuna göre anlamlı azalma tespit edildi, ancak bu değerler kontrol grubuna göre yüksek bulundu (Tablo I). Bu elde ettiğimiz sonuç, daha önce yapılan çalışmaların sonucu ile çelişir gibi görünmektedir. Ancak; İ/R + melatonin grubunda, melato-

nin ya direkt olarak serbest radikal süpürücü etkisi ile ya da indirekt olarak antioksidan savunma sistemlerini güçlendirerek, bu sisteme katkı sağlamaktadır. Bu nedenle melatonin eklene gruplarda, melatoninin bu direkt veya indirekt etkisi ile antioksidan savunma sistemi güçlendiğinden, antioksidan enzimler İ/R grubundaki kadar etkilanmemektedir. Yani melatonin savunma sistemine yardım ederek, ROÜ artışından daha az etkilanmaktadır. Dolayısı ile İ/R + melatonin grubunda, hem MDA hem de PC daha az yükselmektedir. Bu grupta ROÜ artışı İ/R grubuna göre daha az olduğundan, hasar da daha az olmaktadır (Tablo I).

Sonuç olarak, alt ekstremite iskelet kası akut İ/R yaralanması modelinde, melatoninin iskelet kası reperfüzyon yaralanmasına karşı koruyucu etkisi vurgulandı. Uzun akut iskemiye neden olan arter yaralanmalı ekstremite travmaları, akut kompartman sendromu ve turnike süresinin uzadığı ameliyatlar gibi sık karşılaşılan akut iskemi durumlarında, artan oksidatif stresi azaltmak için, melatoninin kuvvetli bir serbest radikal süpürücü etkisinin klinik çalışmalar ile araştırılmasının faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med* 1993;14:191-7.
2. Clanton TL, Zuo L, Klawitter P. Oxidants and skeletal muscle function: physiologic and pathophysiologic implications. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;222:253-62.
3. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000;153:83-104.
4. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 1994;97:55-135.
5. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004;36:1-9.
6. Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 2003;34:1-10.

7. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003;17:273-85.
8. Erkanli K, Kayalar N, Erkanli G, Ercan F, Sener G, Kirali K. Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J Pineal Res* 2005;39:238-42.
9. Kondoh T, Uneyama H, Nishino H, Torii K. Melatonin reduces cerebral edema formation caused by transient forebrain ischemia in rats. *Life Sci* 2002;72:583-90.
10. Lagneux C, Joyeux M, Demenge P, Ribuot C, Godin-Ribuot D. Protective effects of melatonin against ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Life Sci* 2000;66:503-9.
11. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Enzan H, Miyahara Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol* 2003;469:145-52.
12. Sener G, Sehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yeğen BC. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Pineal Res* 2002;32:120-6.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
14. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
15. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
16. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. 2nd ed. New York: Academic Press; 1974. p. 673-7.
17. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In: Packer L, Glazer AN editors. *Methods in enzymology*. Vol. 186. New York: Academic Press; 1990. p. 407-21.
18. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990;36:1440-3.
19. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: Packer L, Glazer AN, editors. *Methods in enzymology*. Vol. 186. New York: Academic Press; 1990. p. 464-78.
20. Klenerman L, Biswas M, Hulands GH, Rhodes AM. Systemic and local effects of the application of a tourniquet. *J Bone Joint Surg [Br]* 1980;62:385-8.
21. Patterson S, Klenerman L. The effect of pneumatic tourniquets on the ultrastructure of skeletal muscle. *J Bone Joint Surg [Br]* 1979;61-B:178-83.
22. Sanders WE. Principles of microvascular surgery. In: Green DP, editor. *Operative hand surgery*. Vol. 1. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1993. p. 1039-83.
23. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. *J Pineal Res* 2005;39:57-65.
24. Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F, Toledo AH. Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/reperfusion. *Ann Transplant* 2004;9:81-3.
25. Ozyurt H, Ozyurt B, Koca K, Ozgocmen S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress. *Vascul Pharmacol* 2007;47:108-12.
26. Petrasek PF, Homer-Vanniasinkam S, Walker PM. Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg* 1994;19:623-31.
27. Reiter RJ. Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol* 1997;38:103-17.
28. Pattwell D, McArdle A, Griffiths RD, Jackson MJ. Measurement of free radical production by in vivo microdialysis during ischemia/reperfusion injury to skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 2001;30:979-85.