

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA METİLGLİOKSAL İLE İNDÜKLENEN
ENDOTEL DİSFONKSİYONUNA MELATONİN'İN
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ayşe Gül GÖNEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2020-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA METİLGLİOKSAL İLE İNDÜKLENEN
ENDOTEL DİSFONKSİYONUNA MELATONİN'İN
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ayşe Gül GÖNEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Arda TAŞATARGİL

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2018-3801 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Farmakoloji Programında Y¼ksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 08/05/2020

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Arda TAŞATARGİL
Akdeniz ¼niversitesi



¼ye : Prof. Dr. Sadi S. ¼ZDEM
Akdeniz ¼niversitesi



¼ye : Dr. ¼ęr. ¼yesi Őukriye YEŐİLOT
Burdur Mehmet Akif Ersoy ¼niversitesi



Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci

Ayşe Gül GÖNEN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Arda TAŞATARGİL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin her aşamasında sahip olduğu bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Arda TAŞATARGİL'e değerli fikirleri, rehberliği ve akademik gelişimime tüm katkıları için,

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda görev alan tüm saygıdeğer hocalarıma,

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi lisans eğitim sürecinden itibaren yanımda olan ve beni her zaman engin bilgileriyle aydınlatan ve yanımda olan Zinnet Şevval AKSOYALP ve Melike Nur AKBAŐ'a

Akdeniz Üniversitesi yüksek lisans eğitimim esnasında bana her zaman yol gösteren Ayşe BARUTÇUGİL ve Dilara NEMUTLU SAMUR'a

Her sorunumuzda bizleri dinleyip, yardımcı olan değerli Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Hayatımın her aşamasında her türlü desteğiyle yanımda olan annem, babam, kardeşime ve biricik kedim Çakıl'a tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, COVID-19 pandemisi esnasında Akdeniz Üniversitesi Hastanesindeki görevimde özveriyle çalışırken aynı zamanda yüksek lisans tezimi tamamladığım için en çok kendime teşekkür ediyorum.

ÖZET

Amaç: Melatonin'in kardiyovasküler sisteme olan yararlı etkileri deneysel ve klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu çalışmanın amacı, metilglioksal (MGO) ile indüklenen endotelial disfonksiyonunda melatonin uygulamasının etkinliğini test etmek ve bunda endotelial nitrik oksit sentazın (eNOS) koruyucu rolünü araştırmaktır.

Yöntem: Çalışmada Wistar sıçanları (12 haftalık) kullanılmıştır. Erkek sıçanlar kontrol, MGO (75mg/kg/gün MGO içme suyu içinde 12 hafta boyunca), MGO + Melatonin (10 mg / kg / gün, 0,1 ml intraperitoneal olarak, içme suyunda MGO ile birlikte 12 hafta boyunca) ve MGO + Taşıyıcı (0,1 ml / gün, 0,1 ml 12 hafta boyunca intraperitoneal olarak, içme suyunda MGO ile eşzamanlı olarak) dört gruba ayrıldı. Torasik aort izole edilip ve yaklaşık 3 mm uzunluğunda halkalar halinde kesildi. İzometrik gerilim çalışmaları, izole organ banyosunda asetilkolin (ACh, endotel bağımlı vazodilatör), sodyum nitroprussid (SNP, endotelden bağımsız vazodilatör), potasyum klorür (KCl) ve fenilefrin (Phe) yanıtlarıyla değerlendirildi. Ayrıca torasik aort halkalarındaki eNOS ve fosfo-eNOS (p-eNOS) (Ser 1177) ve kaspaz-3 ekspresyonları immünohistokimya ile değerlendirildi.

Bulgular: Torasik aortta Phe ve KCl ile indüklenen kasılma yanıtlarında, MGO verilen grupta kontrole kıyasla anlamlı bir değişme gözlenmedi. MGO uygulaması, ACh'nin neden olduğu gevşeme yanıtını önemli ölçüde inhibe ederken, SNP ile gevşeme yanıtları üzerine önemli bir etki göstermedi. MGO uygulanan sıçanların arterlerinde eNOS ve p-eNOS ekspresyonları anlamlı olarak azaldı. Melatonin tedavisi, MGO grubu sıçan damarlarında bozulan endotel bağımlı gevşeme yanıtları yanı sıra eNOS ve p-eNOS ekspresyonlarındaki azalmayı da önemli ölçüde iyileştirdi.

Sonuç: Torasik aortta endotel bağımlı vazodilatasyon MGO uygulaması ile önemli ölçüde inhibe edildi ve melatonin uygulaması vasküler endotelial fonksiyonu iyileştirdi. Melatonin MGO kaynaklı endotelial disfonksiyona karşı eNOS ekspresyonu ve aktivitesindeki artış ile koruyucu etkisini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Endotel Disfonksiyonu, Metilglioksal, Melatonin

ABSTRACT

Objective: The cardiovascular benefits of melatonin have been well established by previous experimental and clinical studies. The aim of this study was to test the effectiveness of MLT administration on the endothelial dysfunction induced by methylglyoxal (MGO), and to investigate the role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) on its protective effect.

Method: Wistar rats (12 weeks old) were used in this study. Male rats were divided into four groups as control, MGO (75 mg/kg/day in drinking water for 12 weeks), MGO + Melatonin (10 mg/kg/day, 0.1 ml, intraperitoneally for 12 weeks concomitant with MGO), and MGO + Vehicle (0.1 ml/day, 0.1 ml, intraperitoneally for 12 weeks concomitant with MGO). The thoracic aorta was isolated and cut into rings of approximately 3 mm in length. Isometric tension studies were performed by an isolated organ bath in response to acetylcholine (ACh, an endothelium-dependent vasodilator), sodium nitroprusside (SNP, an endothelium-independent vasodilator), potassium chloride, and phenylephrine (Phe). Besides, expressions of eNOS, phospho-eNOS (p-eNOS) and caspase-3 in thoracic aorta rings were evaluated by immunohistochemistry.

Results: Phe- and KCl-induced contractile responses in the thoracic aorta were not significantly decreased in MGO-administered group, compared to controls. MGO administration significantly inhibited the relaxation response induced by ACh, while the relaxation to SNP was not significantly altered. In addition, eNOS and p-eNOS expressions decreased significantly in arteries obtained from MGO administered rats. The impaired endothelium-dependent vasodilatation as well as decreased expressions of eNOS and p-eNOS in vessels obtained from MGO group rats were significantly improved by melatonin treatment.

Conclusion: Endothelium-dependent vasodilatation of the thoracic aorta was significantly inhibited by MGO administration, and melatonin may improve vascular endothelial function. The protective effect of melatonin against MGO-induced endothelial dysfunction seems to be via increased eNOS expression and activity.

Key words: Endothelial dysfunction, methylglyoxal, melatonin

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Endotel	3
2.2. Endotel Disfonksiyonu	4
2.3. Metilglioksal	6
2.4. Metilglioksal ve Endotel Disfonksiyonu	7
2.5. Melatonin	9
2.6. Melatonin Reseptörleri	15
2.7. Melatonin ve Antioksidan Etki	16
2.8. Melatoninin Farklı Organ ve Hastalık Modellerinde NO/NOS Üzerine Etkileri	17
2.8.1. Damarlar	17
2.8.3. Oksidatif Stres	18
2.8.4. Enflamasyon	19
2.9. Melatonin Aracılı NO Düzenleyici Mekanizmalar	20
2.9.1. Serbest Radikal Süpürme	20
2.9.2. MT Reseptörü	20
2.9.3. L-Arginin Metabolizması	20
2.9.4. NF- κ B	21
2.9.5. Ca ⁺² / Kalmodulin	21
2.10. Melatonin ve Kardiyovasküler Hastalıklar	22

2.10.1. Kardiyovasküler Hastalık İle İlişkili Olarak Melatonin Düzeylerinin Azalması	22
2.10.2. Kardiyovasküler Sistem	23
2.10.3. Koroner Kalp Hastalığı (KKH)	24
2.10.4. Konjestif Kalp Yetmezliği	25
2.10.5. Miyokard İnfarktları (MI)	25
2.11. Kan Basıncının Düzenlenmesinde Melatonin Mekanizmaları	26
2.11.1. Endotel Bağımlı Vazodilatasyon	26
2.12. Melatonin ve Endotel Disfonksiyonu	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Deney Modeli	30
3.2. Organ Banyosu	30
3.3. Protokol	31
3.4. Biyokimyasal Parametreler	31
3.5. İmmünohistokimyasal Analizler	31
3.5.1. Doku Takibi ve Kesilerin Alınması	31
3.5.2. İmmünohistokimyasal Deneyler	32
3.6. Tunel Floresan Yöntemi	33
3.7. İlaçlar	34
3.8. İstatistiksel Analizler	34
4. BULGULAR	35
4.1. Asetilkolin ile Oluşan Endotele Bağımlı Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi	35
4.2. L-Name İnkübasyonu Sonucunda Asetilkolin ile Oluşan Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi	36
4.3. SNP ile Oluşan Endotelden Bağımsız Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi	37
4.4. KCl ve Fenilefrin ile Oluşan Kasılma Yanıtlarının Değerlendirilmesi	38
4.5. İmmünohistokimya Analizlerinin Değerlendirilmesi	39
4.5.1. eNOS ve p-eNOS immünohistokimyası	39

4.5.2. Cleaved kaspaz-3 immunohistokimyası	40
4.5.3. Tünel Reaksiyonu	41
4.6. Biyokimya Parametrelerinin Değerlendirilmesi	42
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	74

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Endotelden Salgılanan Mediyatörler	3
Tablo 3.1.	Kullanılan antikorlar	33



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Melatonin üretimi ve salgılanmasına aracılık eden nöranal yolak	10
Şekil 2.2.	Melatoninin Pleiotropik Mekanizması	12
Şekil 2.3.	Melatoninin NO/NOS üzerine etkisinin olası mekanizmaları	22
Şekil 2.4.	Melatonin aracılı endotel bağımlı vazodilatasyon mekanizması	27
Şekil 4.1.	Torasik aort halkalarında ACh ile oluşan konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtı.	35
Şekil 4.2.	Torasik aort halkalarında L-NAME (10^{-4} M) inkübasyonu sonrası ACh ile oluşan konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtı.	36
Şekil 4.3.	Torasik aort halkalarında SNP ile oluşan konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtı.	37
Şekil 4.4.	Torasik aort halkalarında 20-80 mM KCl ile oluşan kasılma yanıtı.	38
Şekil 4.5.	Torasik aort halkalarında Fe ile oluşan konsantrasyona bağlı kasılma yanıtı.	39
Şekil 4.6.	Torasik aort halkalarında immünohistokimyasal olarak eNOS ve p-eNOS ekspresyonu	40
Şekil 4.7.	Torasik aort halkalarında eNOS ve p-eNOS ekspresyonunun Image J analizi ile değerlendirilmesi	40
Şekil 4.8.	Torasik aort kesitlerinde Cleaved kaspaz-3 ekspresyonu	41
Şekil 4.9	Torasik aort kesitlerinde TUNEL değerlendirmesi	41
Şekil 4.10	Tüm gruplarda total kolesterol düzeylerinin karşılaştırılması	42

Şekil 4.11.	Tüm gruplarda LDL - kolesterol düzeylerinin karşılaştırılması	42
Şekil 4.12.	Tüm gruplarda HDL - kolesterol düzeylerinin karşılaştırılması	43
Şekil 4.13.	Tüm gruplarda TG düzeylerinin karşılaştırılması	43



SİMGELER ve KISALTMALAR

ACh	: Asetilkolin
ADMA	: Asimetrik dimetilarginin
AG	: Aminoguanidin
AGE	: İleri glikasyon son ürünleri
Akt	: Protein kinaz B
aMT6	: 6-sülfatoksimelatonin
Ang II	: Anjiyotensin II
BMEC	: Beyin mikrovasküler endotel hücresi
CRP	: C-reaktif proteinin
DAB	: Diaminobenzidin
DAG	: Diaçilgliserol
DHAP	: Dihidroksiaseton fosfat
EDRF	: Endotel kaynaklı gevşetici faktör
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
ER	: Endoplazmik retikulum
ET-1	: Endotelin-1
G3P	: Gliseraldehit 3-fosfat
GIS	: Gastrointestinal sistem
GSH	: Glutasyon peroksidaz
HbA1c	: Hemoglobin A1c
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HUVEC	: İnsan umbilikal ven endotel hücresi
I/R	: İskemi/reperfüzyonu

ICAM-1	: İnterselüler adezyon molekülü-1
IL-6	: İnterlökin-6
IP3	: İnositol trisfosfat
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KAH	: Koroner arter hastalığı
KAT	: Katalaz
KB	: Kan basıncı
KCl	: Potasyum klorür
KKH	: Koroner Kalp Hastalığı
KKY	: Konjestif Kalp Yetmezliği
KRS	: Kardiyorenal sendrom
KVH	: Kardiyovasküler hastalıklar
L-arg	: L- arginin
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
L-NAME	: N-nitro-L-arginin metil ester
LPS	: Lipopolikkarit
MCP-1	: Monosit kemoatraktan protein-1
MDA	: Malondialdehit
MG-H1	: Metilglioksal hidroimidazon
MGO	: Metilglioksal
MI	: Miyokard İnfarktları
MI/R	: Miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı
MLT	: Melatonin
MSS	: Merkezi sinir sisteminin
MT	: Melatonin reseptörü

MTNR1B	: Tip B melatonin reseptörü
NAC	: N-asetil-sistein
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa B
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
ONOO-	: Peroksinitrit
p-eNOS	: Fosforile endotelial nitrik oksit sentaz
PHe	: Fenilefrin
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PPKG	: Primer perkütan koroner girişim
PVN	: Paraventriküler çekirdek
RAGE	: İleri glikasyon son ürünlerin reseptörü
RNS	: Reaktif azot türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RZR/ROR	: Transkripsiyon faktörü
sAMP	: Siklik adenosin monofosfat
SCN	: Suprakiasmatik çekirdek
sGC	: Guanilat siklaz
sGMP	: Siklik 3'5' guanozin monofosfat
SNP	: Sodyumnitroprusid
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
STAT3	: Sinyal transdüser ve aktivatör transkripsiyon 3
STEMI	: ST segment elevasyonlu miyokard infarktüsü
TNFα	: Tümör nekroz faktör alfa

VCAM-1 : Vasküler hücre adezyon molekülü-1

VEGFR2 : Vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü 2



1. GİRİŞ

Endotel, damar duvarı ile kan akımı arasında yer alan fonksiyonel bir bariyer olarak tanımlanmaktadır (Iglarz ve Clozel, 2007). Endotel; hemostaz, damar geçirgenliği ve kan basıncı gibi kardiyovasküler birçok temel fonksiyonu kontrol etmektedir. 1980 yılındaki araştırmalarda ortaya çıkan endotel'in vazodilatasyon yeteneği damar biyolojisinde önemli bir gelişmeye yol açmıştır. Endotel; çok sayıda biyolojik aktif madde üreterek damar fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Endotel kaynaklı gevşetici faktörler arasında en temel olanları nitrik oksid (NO), prostasiklin ve endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktördür. NO, endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) aracılığı ile L arginin'den sentezlenir (Palmer ve ark., 1988) ve kısa bir yarı ömre sahiptir (6-7 sn). NO'in üretim veya yararlanımının azalması, endotel disfonksiyonunun ortak özelliğidir (De Vriese ve ark., 2000; Potenza ve ark., 2009). Damar endotel fonksiyon bozukluğu (endotel disfonksiyonu) kardiyovasküler hastalıkların gelişiminin erken bir bulgusudur ve ateroskleroz ve hipertansiyonlu hastalardaki klinik olaylar ile yakından ilişkilidir.

MGO çeşitli biyokimyasal süreçler sırasında oluşan reaktif bir alfa-dikarbonil bileşiği olup, vasküler endotel hücreleri (Schalkwijk ve ark., 2006) ve düz kas hücrelerini de (Wu, 2006) içeren birçok hücrede glikoliz sürecinde spontan olarak sentezlenmekte ve proteinlerin arginin, sistein ve lizin rezidülerine bağlanarak AGE'lerin oluşumuna neden olmaktadır (Ahmed ve ark., 1997; Oya ve ark., 1999). Mevcut kanıtlar, MGO'nun AGE veya glikozdan daha güçlü bir vasküler hasar uyarıcı olduğunu göstermiştir ve bu da artmış serum MGO-kökenli AGE'lerin diyabetik vasküler komplikasyonların alevlenmesinde rol oynadığını gösterir (Bourajaj ve ark., 2003; Yamawaki ve ark., 2008).

MGO; glukozdan daha reaktif ve daha toksik bir bileşiktir ve proteinlerin yanı sıra fosfolipidler ve nükleik asitle de eklentiler oluşturur. Son yıllarda yapılan çalışmalar, yaşla birlikte spontan hipertansif sıçanların (SHR) aortlarında MGO birikiminin arttığını ve bu durumun artmış kan basıncıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (X. Wang, Desai, ve ark., 2005). Ayrıca, MGO uygulamasının Wistar-Kyoto sıçanlarında da kan basıncını arttırdığını gösterilmiştir (Vasdev ve ark., 1998). Bu nedenle, MGO'nun vasküler reaktiviteyi doğrudan etkilemesi olasıdır.

Diyabet, hipertansiyon ve hiperlipidemi yaşlılıkta sık görülen klinik durumlardır. Bu gibi klinik durumlarda artan endojen AGE'ler dışında, insanlar besinlerle de yüksek miktarlarda eksojen MGO'ya maruz kalabilmektedir. Tüm bu sonuçlar, MGO maruziyetinin gittikçe artmakta olduğunu ve çeşitli klinik durumlarda artan MGO'nun endotel disfonksiyonu gelişiminde önemli bir ortak mekanizma olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle; MGO aracılı zararlı etkileri önleme potansiyeline sahip olan bileşikler, MGO düzeylerinin arttığı başta diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi ve yaşlılık gibi klinik durumlarda ortaya çıkabilecek endotel disfonksiyonunun önlenmesinde yararlı olabilir.

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) epifiz bezi tarafından sentezlenip salgılanan ve biyolojik membranları kolayca geçebilen ve özellikle de nükleus ve mitokondrilerde yüksek miktarda bulunan küçük lipofilik bir bileşiktir. Ayrıca, melatonin'in ateroskleroz progresyonuna karşı koruyucu etkisinin olduğu ve endotel fonksiyonunda iyileşmeye neden olduğuna dair sonuçlar da elde edilmiştir (Agil ve ark., 2013; Hu ve ark., 2013). Hayvan modellerinde yapılan araştırmalar melatonin'in NO yolağını iyileştirdiğini ve endotel hasarına, vazokonstriksiyona, trombosit agregasyonuna ve lökosit infiltrasyonuna karşı koruyucu etkileri olabileceğini göstermiştir (Rodella ve ark., 2013). Melatonin'in vazoaktif özelliklerini bildiren çalışmalarda melatonin'in fenilefrin ile kasılmış izole tavşan aort halkalarında endotel bağımlı vazorelaksan etkisinin olduğu görülmüştür.

Melatonin'in vazoaktif özellikleri üzerine birçok çalışma yayınlanmasına rağmen, damarlar üzerinde yüksek MGO maruziyetine bağlı gelişen hasara karşı etkileri daha önce hiç çalışılmamıştır. Tüm bu bilgiler eşliğinde, MGO düzeylerinin artması kan glukoz düzeylerinden bağımsız olarak endotel disfonksiyonu ve hipertansiyon gelişimine neden olan önemli bir faktördür. Bu nedenle bu çalışmada sıçanlarda MGO ile indüklenen endotel disfonksiyonuna melatonin'in koruyucu etkisi ve bu etkide eNOS'un rolü araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endotel

Endotel, damar düz kasında bulunan, damarın iç yüzeyini kaplayan ince bir squamoz epitel tabakasıdır. Damar yüzeyi ve kan arasında tek sıra hücreden oluşmuş fonksiyonel bir bariyerdir. Endotel, sentezleyip ve salgıladığı mediatörler aracılığıyla vasküler homeostazın düzenlenmesinde yer alan en küçük endokrin organdır. Endotel hücresi, fizyolojik ve patolojik uyarılara yanıt olarak çeşitli vazoaktif faktörler salgılayarak damar düz kasının tonusunu ayarlar ve normal kan akımının devam etmesini sağlar. Sağlam bir endotel, antitrombotik, antikoagulan ve fibrinolitik özellik göstermektedir (Onder, 2005). Endotel hücreleri yetişkin bir kişide yaklaşık 1 kg ağırlığındadır ve 5500 m²'den daha fazla yüzey alanına sahiptir. Toplamda endotel hücre sayısı 1 trilyon kadardır (Fishman, 1982). 1980'de Furchgott ve Zawadzki, endotel kaynaklı vazodilatör bir faktör keşfetmişlerdir (Furchgott ve Zawadzki, 1980). Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF), olarak tanımlanan bu faktörün daha sonraları nitrik oksit (NO) olduğu gösterilmiştir (Furchgott, 1996). Normalde endotelden vasküler tonusun düzenlenmesi amacı ile gevşetici ve kasıcı ajanlar salgılanır. (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. Endotelden salgılanan mediyatörler

Vasodilatör	Vazokonstriktör	Antitrombotik (homeostaz) maddeler	Büyüme modülatör / mediatörleri	İnflamatuvar mediatörler
Nitrik oksit (NO=EDRF), Substance P, Adrenomedüllin,	Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE), Tromboksan A2, Nikotin, Araşidonik asit, PGH2, Trombin	Trombomodülin	Büyüme promotörleri; PDGF, Basic FGF, IGF-1, IL-1, Endotelin, AII	Adezyon molekülleri; Endotelial Lökosit Adezyon Molekülü (ELAM), İntraselüler Adezyon Molekülü (ICAM), Vasküler Hücre Adezyon Molekülleri (VCAM)
Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktörler: prostasiklin (PGI2) Bradikinin Asetilkolin Serotonin	Endotelinler (ET-1, ET-2, ET-3)	Doku plazminojen aktivatör (t-PA)	Büyüme inhibitörleri; Heparin sülfat, TGF- β , NO, Bradikinin, Prostatiklin	Antijenler; Major histokompatibilite kompleks 2 (MHCII)
Histamin	Angiyotensin II	Plazminojen aktivatör inhibitör tip I (PAI-1)		

2.2. Endotel Disfonksiyonu

Endotel disfonksiyonu, NO gibi vazodilatörlerin biyoyararlanımında azalma, endotel bağımlı vasodilatasyonda bozulma ve/veya endotel kaynaklı kasıcı ajanların artması sonucu oluşur. Endotel disfonksiyonu, endotelyal aktivasyon ile beraber birçok prokoagülan ve proinflatuar değişiklikleri kapsamaktadır. Endotel disfonksiyonu aterosklerozda, preeklempside, hipertansiyonda, diyabette, üremide ve diğer hastalıklarda tanımlanmıştır (Bonetti ve ark., 2003). Endotel disfonksiyonu karmaşık bir patofizyoloji sonucunda oluşmaktadır ve çeşitli mekanizmalar aracılık etmektedir. Bu mekanizmaların en önemlisi endotelden salınan NO'nun azalmasıdır (Endemann ve Schiffrin, 2004). NO, argininin amino asitinin NO sentetaz enzimi aracılığıyla NO ve L17 sitrulin'e dönüşmesi ile oluşur. NO üç farklı NOS ile sentezlenmektedir. Bunlar; nöronal (nNOS), endotelyal (eNOS) ve indüklenebilir (iNOS)'dur. eNOS ve nNOS; bradikinin ve asetilkolin gibi hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu arttıran ajanlar aracılığıyla indüklenir. iNOS ise sitokinler tarafından uyarılır, kalsiyum bağımlı değildir ve yeni protein sentezi gereklidir. NO sentezinden sorumlu enzim hücre içinde kaveoline bağlı, inaktif formdadır. Hücre içinde kalsiyum artışı ile kalmodulin oluşur, bunun sonucunda enzim kaveolinden ayrılıp aktif hale geçer (Venema ve ark., 1995). Hücre içi kalsiyum artışı olmadan da NO üretilebilir. NO fosforilasyonu sonucunda "shear stress" NO düzeyini kontrol edebilmektedir. NO serbest halde diffüze olabilen bir gazdır, damar lümeninin haricinde onu çevreleyen düz kasa ve dokularada etki edebilmektedir. NO vasküler düz kas hücrelerine girerek guanilat siklazı aktive eder ve siklik 3'5' guanozin monofosfat (sGMP) seviyelerini arttırır. sGMP, düz kas hücresinde sGMP bağımlı protein kinazı aktive eder, bu da potasyum kanallarının fosforile, kalsiyum kanallarının ise hiperpolarize olmasını sağlar. Hücre içi kalsiyum miktarının azalması ile düz kas hücresinde gevşeme meydana gelir (Venema ve ark., 1995). NO ayrıca sodyum ve potasyum kanallarına direk etki ederek aktive olmalarını sağlar ve vazodilatasyona katkıda bulunur (Bolotina ve ark., 1994). N-nitro-L-arginin metal ester (L-NAME) gibi arginin analogları NO üretimini bloke edebildiklerinden, L-NAME varlığında NO etkileri ayrıntılı olarak çalışılabilmektedir. NO en önemli endotel-kaynaklı gevşetici faktördür ve vasodilatasyonun, vasküler tonusun ayarlanmasında önemli bir rolü vardır. NO ayrıca, inflamasyon ve trombozize karşı koruyucu özelliğe sahiptir. NO, endotele lökosit

adhezyonunu inhibe eder ve platelet agregasyonunu sınırlar (Cornwell ve ark., 1994; Gauthier ve ark., 1995).

NO düzeylerinin azalması ile endotel disfonksiyonun ilişkili olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir. Bu durum eNOS enzim aktivitesinin azalması sonucunda veya NO biyolojik aktivitesindeki azalmadan kaynaklanabilir. NO ve serbest oksijen radikalleri (ROS) etkileşimi sonucunda peroksinitrit oluşmaktadır, peroksinitrit proteinlerde nitrasyona neden olup hücrel proteinlerin fonksiyonunu bozar ve endotel disfonksiyonuna neden olur. Peroksinitrit, eNOS kofaktörü tetrahidrobiopterin ile reaksiyona girerek eNOS'un aktivitesini azaltır. Oksidatif stress artışı sonucunda eNOS enziminin redüktaz fonksiyonu aktifleşir ve daha fazla ROS oluşur. ROS, damar duvarında proinflamatuvar sürecin başlamasına neden olur. ROS adezyonu (Vasküler hücre adezyon molekülü-1; VCAM-1 ve interselüler adezyon molekülü-1; ICAM-1) ve kemotaktik molekülleri (monosit kemoatraktan protein-1; MCP-1) artırır. NO aktivitesi inflamasyon sonucunda azalır. C-reaktif proteinin (CRP) de eNOS aktivitesini azaltmaktadır (Endemann ve Schiffrin, 2004). CRP seviyesinin artması sonucunda NO'in üretimi baskılanır ve biyoaktivitesi azalır, bu da endotel disfonksiyona neden olabilir (Verma ve Anderson, 2002).

Hipertansiyon, hiperkolestrolemi ve diyabet gibi kardiovasküler risk faktörleri endotelin bozulmasına neden olur. Hiperkolestrolemi vasküler homeostazda birçok değişikliğe yol açar. NO biyoaktivitesini azaltır, endotelin reaktivitesini ve superoksit üretimini artırır (Lerman ve ark., 1993). Hiperkolestrolemik durumda, normalde lökosit adezyonuna dirençli endotel tabakasına kandaki lökositlerin bağlanması kolaylaşır (Libby ve ark., 2002). Okside düşük dansiteli lipoprotein (LDL), NO'nun hücre içi konsantrasyonunu ve endotel aktivasyonunu azaltarak biyolojik yapının değişmesine neden olmaktadır (Cominacini ve ark., 2001). Kolesterolün indüklediği endotel disfonksiyonu esas olarak LDL oksidasyonu ile ilgilidir, LDL konsantrasyonunun yüksek olması esas neden değildir (Anderson ve ark., 1996).

Hipertansiyon; vazokonstriktör maddelerde artışa veya vazodilatör maddelerdeki azalmaya bağlı olarak endotel kaynaklı vazoaktif faktörler arasındaki dengesizlik sonucunda oluşabilmektedir. Anjiyotensin II (Ang II), vasokonstriktör bir ajandır ve

NO'in tersi bir etkiye sahiptir. Anjiyotensin II ROS üretimine, interlökin-6 (IL-6) ve MCP-1 gibi proinflamatuvar sitokin ekspresyonlarının artmasına ve endotel hücrelerinde VCAM-1'in etkisinin artmasına neden olur (Kranzhofer ve ark., 1999; Tummala ve ark., 1999).

Bu endotel değişiklikler damarlarda inflamasyona neden olur, bu da aterosklerotik lezyonların başlamasına ve ilerlemesindeki ilk basamaktır.

2.3. Metilglioksal

Dikarbonil aldehit olan Metilglisokal (MGO), glikoliz sonucu oluşur (Phillips ve Thornalley, 1993). MGO organizmada bulunan diğer moleküller ile reaksiyona girerek hücre ve dokularda fonksiyon bozukluğuna neden olur. Hücreler ana enerji kaynağı olarak glikoz kullanırken ve glikozlarının çoğunu glikojen gibi reaktif olmayan moleküllerden saklarken, spontan ve önlenemeyen bir şekilde Embden Meyerhof yolağından gerçekleşen sızıntı sonucunda memeli hücrelerinde MGO oluşur. gliseraldehit 3-fosfat (G3P) ve dihidroksiaseton fosfatın (DHAP) enzimatik olmayan parçalanmasıyla glikotrioz akışında yaklaşık olarak % 0.1 MGO oluştuğu tahmin edilmektedir (Rabbani ve ark., 2016). Bu nedenle, normoglisemik koşullar altında glikoliz sonucunda günde yaklaşık 125 mol/kg hücre kütlesi oranında MGO oluşur (Thornalley, 1988). Bu durum, hiperglisemide artan glikoz metabolizması (Babaei-Jadidi ve ark., 2003), pentoz yolunda bozulma ile azalan GA3P imhası veya hipokside meydana gelen artmış anaerobik glikoliz bozukluğu (Seagroves ve ark., 2001) gibi yüksek triosfosfat konsantrasyonlarına yol açan koşullar altında daha da artabilir. Keton cisimciklerinin katabolizmasındaki aseton oksidasyonu (Beisswenger ve ark., 2005), treonin katabolizmasındaki aminoaseton oksidasyonu (Lyles ve Chalmers, 1992), lipit peroksidasyonu ve glikolize proteinlerin ve monosakaritlerin bozunması (Kalapos, 1999; Thornalley ve ark., 1999) ile de az miktarda MGO oluşmaktadır.

MGO seviyeleri, bal gibi doğal ürünlerde ve özellikle işlenmiş yiyecek ve içeceklerde (alkolsüz içecekler, kahve ve süt ürünleri gibi) son derece yüksek bulunmuştur (Nemet ve ark., 2006; Degen ve ark., 2012). Aslında gıda maddelerindeki MGO seviyeleri, ısıtma, uzun süreli depolama ve fermentasyon nedeniyle artmaktadır (Martins ve Van Boekel, 2003). Alkollü içeceklerde ve peynirde ise MGO, mikroorganizmalar tarafından

salgılandığı için artmaktadır (Nemet ve ark., 2006). Ozonlama ve klorlama gibi işlemlerden geçirilmiş içme suyunda bile değişken seviyelerde MGO bulunabilir (do Rosario ve ark., 2005). Ayrıca kirli havanın eksojen bir MGO kaynağı olduğu da dikkate alınmalıdır. Özellikle, sigara iç mekanlardaki hava kirliliğinin ana nedenidir (Fujioka ve Shibamoto, 2006). Bu eksojen MGO kaynaklarının plazma MGO düzeyleri için önemli olup olmadığı henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Birçok çalışma, serbest MGO'nun bağırsakta sindirim sırasında hızla bozunduğunu ve in vivo olarak MGO seviyesini etkilemediğini bildirmektedir (Degen ve ark., 2013). Ancak, MGO katkılı diyetlerle beslenen kemirgenlerde beyin ve serumda MGO biriktiğini ve MGO kaynaklı AGE'lerin en az %10'unun emildiğini ve daha sonra damar, kalp, karaciğer, böbrek ve adipoz doku gibi dokularda biriktiğini gösteren çelişkili kanıtlar vardır (Cai ve ark., 2014; Maessen ve ark., 2015).

Sağlıklı insanlarda MGO seviyelerinin yaklaşık olarak plazmada 50-150 nM, dokularda ise 1-4 nM olduğu tahmin edilmektedir (Rabbani ve Thornalley, 2014). MGO birikimi bu seviyeleri aştığında, jenerasyon/maruz kalma ve MGO metabolizması arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak dikarbonil stres ortaya çıkmaktadır (Rabbani ve Thornalley, 2015).

2.4. Metilglioksal ve Endotel Disfonksiyonu

Son yıllarda, MGO'nun vasküler disfonksiyonda ana sebep olduğunu öne süren çok sayıda çalışma yayınlanmıştır (Shamsaldeen ve ark., 2016). Endotel disfonksiyonu, kardiyovasküler hastalık gelişimindeki en önemli faktörlerden biridir. Son zamanlarda yapılan derlemelerde, zararlı ajanların endotel disfonksiyonunu nasıl indüklediği ve endoplazmik retikulum stres yanıtını nasıl arttırdığı ortaya konmaktadır (Cimellaro ve ark., 2016). Vasküler endotel, vasküler homeostazı düzenleyen otokrin ve parakrin organ olarak hareket eder (Szmítko ve ark., 2003).

Bu denge bozulduğunda, lökosit yapışması, trombosit aktivasyonu, mitogenezis, pro oksidasyon, trombozis ve pıhtılaşma bozuklukları, vasküler inflamasyon ve ateroskleroz ile birlikte vazokonstriksiyon meydana gelebilir. Endotel tarafından üretilen biyoaktif moleküller arasında NO'nın vasküler homeostazın korunmasında önemli bir rolü vardır. NO, Ang II ve Endotelin-1 (ET-1) gibi güçlü kontraktıl faktörlerinin etkisini engelleyip,

bazal ve indüklenmiş vasküler düz kas gevşemesini koruyarak damar tonusunu kontrol eder. Ek olarak, NO trombosit aktivasyonunu ve lökosit adhezyonunu, ayrıca VCAM ve MCP-1'in sitokin ile indüklenmiş ekspresyonunu inhibe eder, bu da antienflamatuar etkiyi uyarır (Verma ve Anderson, 2002).

MGO, ağırlıklı olarak proteinler üzerindeki arginin kalıntıları ile reaksiyona girer, in vivo en yaygın MGO türevi AGE modifikasyonu olan metilglükoksil hidroimidazon (MG-H1), hedef proteinlerin yapısal olarak değişmesine, inaktivasyonuna ve bozulmasına neden olur (Schalkwijk, 2015). Bu nedenle, artan MGO seviyeleri, organizmanın farklı bölgelerinde ve farklı yollarla endotel fonksiyonunu bozar. Birçok çalışma, oksidatif stresin aracılık ettiği MGO kaynaklı endotel bağımlı gevşemede bozulma olduğunu göstermiştir. Aslında, sıçanların aort dokusunda asetilkolin kaynaklı dilatasyon, yüksek glukoz ve MGO nedeniyle bozulmaktadır. Bu etki, MGO süpürücüleri aminoguanidin (AG) ve N-asetil-sistein (NAC) (A. Dhar ve ark., 2010), NADPH oksidazın inhibisyonu (Mukohda ve ark., 2013) aracılığıyla hafifletilir ve Glo1 aşırı ekspresyonu ile önlenir (Brouwers ve ark., 2010). Fare korpus kavernoza'da polifenol gibi anti-oksidanlar koruyucu etkisinin, MGO bağımlı NO salınımindaki bozulmayı engelleyip ve endotel kaynaklı gevşemeyi artırarak ortaya çıktığı bildirilmiştir (Boydens ve ark., 2016). MGO'nun apoptotik süreci ilerleten ROS'u arttırdığı ve sitoprotektif protein tioredoksinin transkripsiyonunu azalttığı ileri sürülmüştür (Oba ve ark., 2012). Ayrıca mevcut kanıtlar fizyolojik anjiyogenezin MGO tarafından, RAGE aracılı ve otofaji kaynaklı vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü 2 (VEGFR2) yıkımı ile bozulduğunu göstermektedir (Liu ve ark., 2012).

Goto-Kakizaki diyabetik sıçanlarla yapılan bir çalışmada MGO uygulaması, oksidatif stres, AGE oluşumu, NO biyoyararlanımında azalma ve enflamasyonda artışa ek olarak endotel disfonksiyonuna da neden olmuştur (Sena ve ark., 2012). Arter çeperinde MGO birikiminin, spontan hipertansif sıçanlarda vasküler kasılma fonksiyon bozukluğuna neden olduğu (Mukohda ve ark., 2012), MGO tedavisinin RAGE ile NFkB'yi aktive ettiğini, böylece Sprague-Dawley sıçanlarında renin-anjiyotensin seviyelerini ve kan basıncını arttırdığını göstermiştir (I. Dhar ve ark., 2014). Bu bulgular, MGO'nun

ateroskleroz patogeneğinde ve makrovasküler diyabetik komplikasyonların gelişiminde bir faktör olduğuna kanıt niteliğindedir.

MGO'nun zararlı etkisinin ana hedefi, endotel bağımlı NO salınımında ve bunun sonucunda gerçekleşen düz kas gevşemesinde etkili olan endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimidir. Gerçekten de, sıçan izole mezenterik arter (Mukohda ve ark., 2013) ve torasik aort halkalarının (Turkseven ve ark., 2014) uzun süreli MGO maruziyeti sonrasında eNOS protein seviyeleri ve aktif fosforile edilmiş formu (serin 1177) azalmıştır.

MGO ve MGO kaynaklı AGE'lerin makrovasküler fonksiyonun yanı sıra, mikrovasküler fonksiyon üzerinde de zararlı etkileri vardır, nefropati ve nöropati başlangıcında rol oynarlar. MGO birikimi sonucu, diyabetik Goto-Kakizaki sıçanlarda böbrek hastalığı belirteçleri gözlenmiştir (Rodrigues ve ark., 2014). MGO, beyin endotel hücrelerinin bütünlüğünü azaltıp geçirgenliğini artırarak kan-beyin bariyeri hasarına neden olur (Toth ve ark., 2014). Beyin mikrovasküler endotel hücresi (BMEC) geçirgenliğinde artmalara ve işlevsiz sıkı bağlantı bölgeleri gibi anormalliklerin ortaya çıkmasına neden olan bir mekanizma olarak okludin-MGO oluşumu gösterilmektedir (W. Li ve ark., 2015). BMEC'ler beyin damar onarımı ve bakımı için çok önemlidir. Hem in vitro (Fang ve ark., 2015; W. Li ve ark., 2016) hem de in vivo (Alomar ve ark., 2016) beyin iskemisi modellerinden elde edilen son kanıtlar, MGO'nun BMEC hasarını indüklediğini ve diyabetik sıçanlarda iskemi-reperfüzyon hasarını arttırdığını göstermektedir.

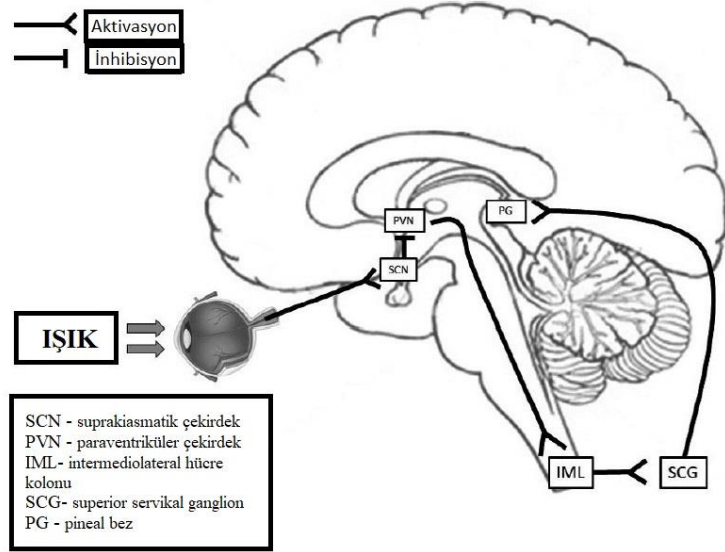
Bu bulgulara dayanarak, vasküler fonksiyonların korunmasında MGO birikiminin veya zararlı etkilerinin etkili bir şekilde azaltılmasının çok önemli olduğu anlaşılmaktadır.

2.5. Melatonin

Melatonin veya N-asetil-5-metoksitriptamin, insanda sirkadiyen ritmi düzenleyen ve düşük ışığa yanıt olarak epifiz bezi tarafından salgılanan doğal bir hormondur ve yaklaşık yarım yüzyıl önce keşfedilmiştir. Şu anda insan vücudunun biyolojik saati olan birincil rolünün yanı sıra, birçok fizyolojik fonksiyonda yer alan önemli bir nörohormon olarak kabul edilmektedir (Pandi-Perumal ve ark., 2006). Düşük ışık koşullarında, suprakiasmatik nükleusta başlayan ve epifiz bezinde sona eren melatonin üretimi ve

sekresyonunun artmasına neden olan bir aktivasyon kaskadı vardır (Moore, 1996). Melatonin üretimine ve salgılanmasına aracılık eden nöronal yol aşağıdaki gibidir:

1. Işık, retinayı uyararak suprakiasmatik çekirdekleri (SCN) aktive eder
2. SCN'nin aktivasyonu paraventriküler çekirdeği (PVN) inhibe eder
3. PVN, omuriliğin T1-T3 segmentlerindeki sempatik (IML) çekirdeğe yansır
4. IML, melatonin üretimini ve salgılanmasını arttırmak için epifiz bezine yansıyan süperiyör servikal gangliyonlara projeksiyon yapar (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Melatonin üretimi ve salgılanmasına aracılık eden nöronal yolak

Işık, SCN'nin aracılık ettiği sempato-uyarma ve vagal supresyon yanıtlarının oluşmasına neden olur (Mutoh ve ark., 2003). Işık varlığında, PVN, SCN tarafından inhibe edilir, böylece sinyal kaskadının geri kalanı da inhibe olur. Buna karşılık, düşük ışık varlığında, nöronal aktivasyon yolunun geri kalanının devam etmesi için PVN'nin disinhibisyonu gerçekleşir (Moore, 1996). Melatonin, epifiz bezi tarafından üretilir ve salgılanır.

Kanıtlar melatoninin sergilediği olağanüstü etki çeşitliliğini (pleiotropik etkiler) ortaya koymaktadır. Bu bilgilerden dolayı günümüzde birçok araştırmacı tarafından pleiotropik bir molekül olarak kabul edilmektedir (Hardeland, 2009; Hardeland ve ark., 2011).

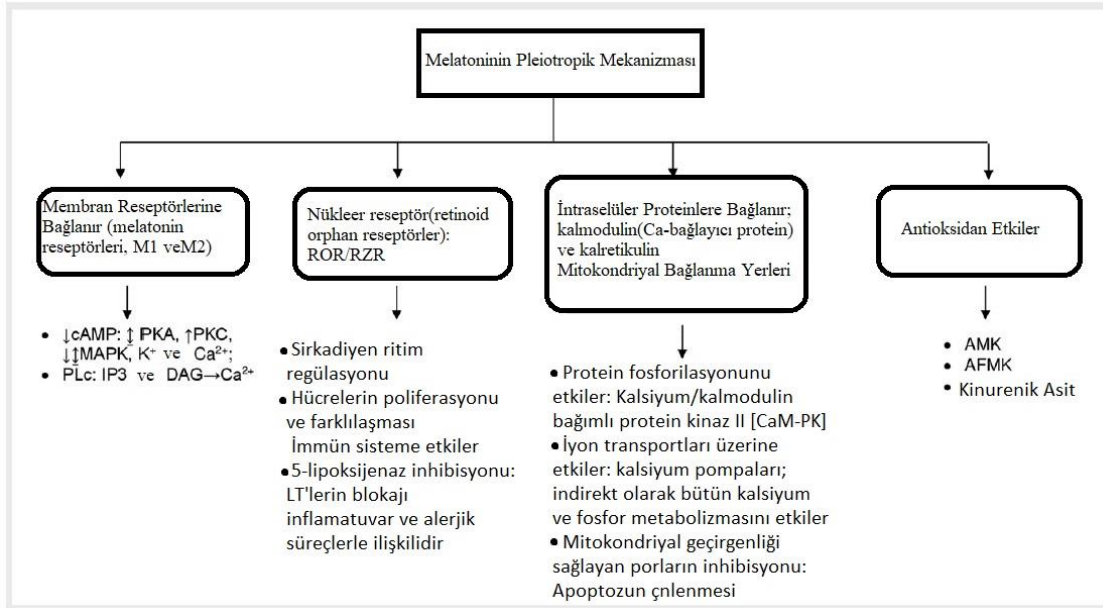
“Pleiotropi” Yunanca kökenli bir kelimedir; “pleion” daha fazla, “tropy” ise tepki veya uyaran anlamına gelmektedir. Pleiotropik etki, ilacın birincil etki mekanizmasıyla ilişkili veya ilişkisiz olabilen farklı mekanizmalar yoluyla ilaca benzer çoklu fizyolojik etkiler vermesidir. Melatoninin bütünleyici bir rol oynadığı ve karmaşık sinyalizasyon süreçlerini düzenlediği bilinmektedir ve bu nedenle çok sayıda fizyolojik fonksiyonda rol oynar (Hardeland ve ark., 2011). Düşük melatonin üretimi veya melatonin reseptör ekspresyonu ve yaşlanma sırasında ortaya çıkan düşük melatonin seviyeleri, gastrointestinal bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar, metabolik hastalıklar (örn. Obezite, diabetes mellitus, hiperlipidemi), kemik döngüsü bozuklukları (Dominguez-Rodriguez ve ark., 2012; Sharma ve ark., 2015), kanserler (Hanikoglu ve ark., 2018), inflamatuvar ve bağışıklık bozuklukları (Radogna ve ark., 2010), yaşlanma ve Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, otizm, dikkat eksikliği hiperaktivite bozuklukları gibi nörodejeneratif bozukluklar ve anksiyete, depresyon, şizofreni, epilepsi, uyku bozuklukları, diğer çeşitli psikiyatrik ve nörolojik bozukluklar gibi sinir sistemi hastalıkları (Mahmood ve ark., 2016) ile ilişkilendirilmiştir. Melatonin şu anda pediatriye uykusuzlukla beraber, dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu, ateşli nöbetler ve epilepsi gibi nörogelişimsel bozukluğu olan çocuklarda ve pediatrik anestezide kullanılmak üzere araştırılmaktadır (Sanchez-Barcelo ve ark., 2011). Melatonin, gündüz/gece döngüsünü ve hipotalamik/hipofiz eksenlerini kontrol etmenin yanı sıra; vazomotor etkiler, immünomodülasyon, antilipid etkiler, endokrin fonksiyonların modülasyonu, doğrudan ve dolaylı antiapoptotik etkiler, nitrik oksit sinyalizasyonu ile etkileşim, iyon kanalları ve nörotransmitter sistemleri aracılığıyla diğer anti-uyarıcı etkileri ve en belirgin şekilde mitokondriyal elektron akısının modülasyonu dahil olmak üzere redoks metabolizması ile ilgili genlerin ekspresyonunu içeren antioksidan aktiviteleri kontrol eder.

Melatoninin, gastrointestinal sistem (GIS), epitelyal kıl folikülleri, cilt, retina, tükürük bezleri, trombositler, lenfositler gibi ekstrapineal üretim alanlarına sahip olduğu bildirilmiştir (Izykowska ve ark., 2009). Melatonerjik reseptörlerin vücutta yaygın ekspresyonu; pinealositoz olmayan bölgelerde sentez, biyoaktif metabolitlerin oluşumu, sirkadiyen dinamiğe az veya neredeyse hiç katılımı olmayan belirli dokularda melatonin reseptörlerinin varlığı ve melatoninin gözlemlenen endo, para, oto ve intrakrin etkileri (Tan ve ark., 2003) pleiotropik etkisini vurgulamaktadır (Hardeland, 2008).

Melatonin esas olarak dört farklı mekanizma aracılığıyla pleiotropik etkilerini göstermektedir: membran reseptörlerine bağlanma; nükleer reseptörler; hücre içi proteinler ve reseptörden bağımsız radikal süpürme fonksiyonu (Şekil 2.2) (Vanecek, 1998).

Melatonin lipofilik yapısıyla biyolojik zarlara nüfuz edip hücre ve çekirdeğe serbestçe girer. Melatonin, nükleer reseptör süper familyasının yetim üyesi olan transkripsiyon faktörü RZR/ROR aracılığıyla nükleer sinyalizasyon gerçekleştirir.

Melatonin kalmodulin gibi hücre içi proteinlere bağlanarak hücresel fonksiyonları etkilemektedir. Kalmodulin, kalsiyum iyonlarını bağlayan ve aktif bir kompleks oluşturan, kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II gibi protein fosforilasyonundan sorumlu çeşitli enzimleri uyaran endoplazmik retikulum içindeki önemli bir kalsiyum bağlayıcı proteindir. Ayrıca melatoninin, plazma membranında yer alan kalsiyum pompaları (kalsiyum adenosin trifosfat) olarakta adlandırılan iyon taşıyıcılarının işlevini değiştirir, bu da melatoninin dolaylı olarak tüm hücresel kalsiyum ve fosfat iyonlarının metabolizmasını etkilediğini göstermektedir (Vanecek, 1998).



Şekil 2.2. Melatoninin pleiotropik etkisi

Melatoninin en çok araştırılan etki mekanizması, mükemmel olarak adlandırılan serbest radikal temizleme özelliğidir. Son yıllarda serbest radikaller ve oksidatif stres, yaşlanma, kanser, ateroskleroz, nörodejeneratif bozukluklar, diyabet, inflamatuvar hastalıklar gibi birçok hastalığın patofizyolojisi ile ilişkilendirilmiştir. Melatonin ve metabolitlerinin serbest radikal süpürme ve antioksidan aktiviteleri vardır (Hardeland, 2005). Melatoninin antioksidan özellikleri, doğrudan serbest radikal süpürme, antioksidatif enzimlerin uyarılması, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon özelliklerinin artırılması, elektron kaçağının azaltılması (böylece serbest radikal üretiminin azaltılması) ve diğer antioksidanların etkinliğinin güçlendirilmesi gibi etkilerinden kaynaklanmaktadır.

Ayrıca melatonin dolaylı olarak Cu, Zn-süperoksit dismutaz, katalaz ve sitosolik glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimleri aktive eder ve reaktif oksijen ve azot türlerini doğrudan deaktive eder. Önemli bir antioksidan, bir serbest radikal temizleyici ve detoksifiye edici ajan olan glutatyon sentezini indükler, ayrıca mitokondriyal solunum zinciri kompleksindeki elektron taşınmasını düzenler ve son zamanlarda mitofajiyi (otofaji sonucu mitokondride seçici bozunma) indüklediği ve mitokondri homeostazisini geliştirdiği bulunmuştur (Tan ve ark., 2016). Böylece, melatonin, in vivo antioksidan özellikleri ile melatonin-bağımlı bir antioksidan sistem oluşturabilir ve C ve E vitamininin antioksidan etkilerine eşit veya daha güçlü antioksidan etki gösterebilir (Tengattini ve ark., 2008).

Melatoninin glikoz metabolizmasında rolünün olabileceğini düşündüren kanıtlar vardır. Melatonin alan diyabet eğilimli sıçanlar kontrolle karşılaştırıldığında, diyabetin başlangıcına göre hayvanların kolesterol ve trigliserit seviyelerinde görülen iyileşmeler melatoninin koruyucu etkisini göstermektedir (Prunet-Marcassus ve ark., 2003; Puchalski ve ark., 2003; Sartori ve ark., 2009). Birkaç çalışmada, tip B melatonin reseptöründeki (MTNR1B) tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) daha yüksek açlık glikoz seviyeleri, daha yüksek hemogloblin A1c (HbA1c) ve gestasyonel ve tip 2 diyabet insidansında artma ile ilişkilendirilmiştir (Bouatia-Naji ve ark., 2009). Melatonin reseptörünün işlev kaybına neden olan bu SNP'ler, yüksek tip 2 diyabet insidansıyla ilişkilidir (Bonfond ve ark., 2012). Endojen melatoninin insanlarda glikoz metabolizması üzerindeki etkisi bilinmemekle birlikte, hayvan verileri ve insan genetik çalışmaları düşük melatonin

salgılanmasının veya azaltılmış melatonin sinyalizasyonunun insülin duyarlılığını bozabileceğini ve tip 2 diyabete yol açabileceğini düşündürmektedir.

Deneysel çalışmalar melatoninin glukoz metabolizması üzerinde yararlı etkileri olduğunu göstermektedir. Oral melatonin tüketimi, diyabet eğilimli sıçanları, yüksek kalorili diyetle hiperlipidemi, hiperglisemi ve hiperleptinemi gelişmesine karşı korur (Prunet-Marcassus ve ark., 2003), insülin dirençli farelere melatonin uygulanması insülin direncini tersine çevirir ve glukoz metabolizmasını düzeltir (Cuesta ve ark., 2013). İnsan pankreatik adacık hücreleri ile yapılan in vitro çalışmalarda, melatonine uzun süre maruz kalan adacık hücrelerinde glukoz duyarlılığının arttığı gözlenmiştir (Kemp ve ark., 2002; Ramracheya ve ark., 2008). Melatonin maruziyeti, invitro adacık hücrelerinin PI3K/AKT ve MEK/ERK sağkalım ve büyüme yollarını aktive eder, bu da pinealektomi sonrası sıçanlarda gözlenen düşük pankreatik adacık yoğunluğunu açıklamaktadır (Picinato ve ark., 2008).

Melatoninin diyabet ilerleyişindeki koruyucu etkisi, insanlarda yapılan kesitsel çalışmalarla da desteklenmektedir. Peschke ve ark., 6 diyabetik ve 5 kontrol hastasının noktürnal plazma melatonin düzeylerini karşılaştırmış ve diyabetik hastaların noktürnal melatonin düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğunu bulmuşlardır (Peschke ve ark., 2006). Benzer şekilde, Hikichi ve ark., 56 kişide yaptığı çalışmada, noktürnal plazma melatoninin, proliferatif diyabetik retinopatisi (N = 14) olan kişilerde sağlıklı deneklere (N = 26) (10.9 pg/ml'ye karşılık 37.5 pg/ml, $p < 0.01$) oranla düşük olduğunu bulmuşlardır, ancak proliferatif retinopatisi olmayan diyabetliler (N = 16) ve sağlıklı kişiler (31.1 pg/ml'ye karşı 37.5 pg/ml) karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Hikichi ve ark., 2011). Bu nedenle araştırmacılar, melatonin ve diyabet arasındaki ilişkiye muhtemelen işlevsiz retina ışık algısı ve bunun sonucunda azalan melatonin sekresyonunun aracılık ettiğini ileri sürmüşlerdir. Metabolik sendromlu 21 hastanın ve 19 sağlıklı kontrolün yer aldığı bir çalışmada, noktürnal plazma melatonin ve insülin düzeyleri metabolik sendromlu hastalar arasında pozitif korelasyon gösterdiği ($r = 0.64$), ancak kontroller arasında korelasyon olmadığı bulunmuştur (Robeva ve ark., 2006, 2008).

Düşük melatonin sekresyonu ve artan insülin direnci arasındaki ilişki göz önüne alındığında, insülin direncinin melatonin sekresyonu ve tip 2 diyabet arasındaki

nedensellikte bir ara basamak olması mümkündür. İlginçtir ki, insülin duyarlılığının iyileştirilmesi, melatonin sekresyonu ile diyabet arasındaki ilişkiyi değiştirmemiştir.

2.6. Melatonin Reseptörleri

İnsanlarda üç tip melatonin reseptörü (MT) tanımlanmıştır: MT1 ve MT2, G protein kenetli transmembran reseptörleri (Dubocovich, 1995; Dubocovich ve Markowska, 2005), MT3, kinon redüktaz ailesine aittir (Witt-Enderby ve ark., 2003). Melatonin reseptörleri, GIS, kalp, arterler, karaciğer, böbrekler, prostat bezi, uterus, cilt ve gözler dahil olmak üzere neredeyse tüm periferik organlarda bulunur. Ayrıca merkezi sinir sisteminin (MSS) çeşitli bölgelerinde de bulunmaktadır. İnsanlarda, sadece MT1 ve MT2 reseptörlerinin kardiyovasküler regülasyonda fonksiyonel bir rolü olduğu tespit edilmiştir. MT1 ve MT2 reseptörleri yapısal ve işlevsel olarak birbirinden farklıdır.

Yapısal olarak MT1 ve MT2 reseptörleri sırasıyla 350 ve 362 amino asit uzunluğundadır (Dubocovich ve Markowska, 2005). Reseptör bağlanmasını takiben, melatonin hücre içi sinyalizasyonuna adenilat siklaz, fosfolipaz C, guanilat siklaz ve kalsiyum kanallarının düzenleyici aktiviteleri aracılık eder (Pandi-Perumal ve ark., 2008). Melatonin, membran reseptörlerine bağlanarak ve siklik adenosin monofosfat (sAMP), sGMP, inositol trisfosfat (IP3), diaçilgliserol (DAG), araşidonik asit veya hücreiçi kalsiyum iyon (Ca^{+2}) konsantrasyonunu içeren bir dizi ikincil habercilerle hücrel sinyalizasyona aracılık eder (Vanecek, 1998). MT1 ve MT2 reseptörleri, adenilat siklazın Gi-kenetli inhibisyonu ile ilişkilidir, bu da sAMP üretimini inhibe eder (Dubocovich, 1995). Melatonin reseptörünün aktivasyonu, protein kinazlarının aktivitelerini modüle eden sAMP seviyelerinin azalmasına, mitojenle aktive olan protein kinazların düzenlenmesine, sGMP seviyelerinde azalmaya ve potasyum ve kalsiyum iyon kanal fonksiyonlarının modülasyonuna neden olur (Vanecek, 1998). Ayrıca melatonin reseptörleri, fosfatidil inositol 4,5-bisfosfatın hidrolizi sonucunda IP3 ve DAG oluşturan fosfolipaz C (PLC) 'yi aktive eder. IP3, endoplazmik retikulum üzerinde IP3 reseptörü ile bağlanır ve depolanan Ca^{+2} salınır, bu da hücre içi Ca^{+2} iyon konsantrasyonunun artmasına neden olur (Vanecek, 1998).

Ek olarak, Gq-kenetli aktivasyonu ile gerçekleşen reseptör bağlanması fosfolipaz C'yi aktive eder ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar (MacKenzie ve ark., 2002;

Slominski ve ark., 2012). MT1 reseptörlerinin aksine, MT2 reseptör bağlanması aynı zamanda guanilil siklaz ve sonucunda da sGMP üretimini düzenler (Petit ve ark., 1999).

Melatonin sirkadiyen ritmik ve mevsimsel döngüde kilit bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, melatonin reseptörlerinin merkezi sinir sisteminde yüksek yoğunlukta bulunur, ayrıca hipofiz, hipotalamus, suprakiasmatik çekirdek, paraventriküler çekirdek ve sıçan (Vanecek ve ark., 1987), hamster (Vanecek ve Jansky, 1989), primat (Stankov ve ark., 1993) ve insan (Reppert ve ark., 1988) hipokampusunda da bulunması şaşırtıcı değildir. Melatonin reseptörleri sinir sistemindeki yaygın dağılımına benzer oranda, merkezi ve periferik vaskülatürde de bulunur. Sıçanların (Capsoni ve ark., 1994) ve primatların (Stankov ve ark., 1993) vertebral arterlerinde ve Willis çemberinde fonksiyonel melatonin reseptörleri tanımlanmıştır. Bu arada, sıçanların kaudal arterinde (Masana ve ark., 2002), civcivlerin (Pang ve ark., 2002) koroner arterlerinde ve primatlarda (Stankov ve ark., 1993) iç karotidlerde periferik reseptörler tanımlanmıştır. İnsan kardiyovasküler sisteminde melatonin reseptörleri, serebral arterler, koroner arterler, aort, kardiyak ventriküler duvar ve sistemik arterlerde bulunur (Ekmekcioglu ve ark., 2001; Ekmekcioglu ve ark., 2003). İnsan kardiyovasküler sistem içindeki reseptörlerin yaygın dağılımı göz önüne alındığında, melatoninin çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda belirteç olması şaşırtıcı değildir.

2.7. Melatonin ve Antioksidan Etki

Oksidatif stres birçok patofizyolojik duruma neden olmaktadır ve hipertansiyon ile sıkı bir şekilde ilişkilendirilmektedir. ROS ve reaktif azot türleri (RNS) DNA hasarına neden olur, hücre fonksiyonu ve bütünlüğü üzerine zararlı etkileri vardır. Antioksidan savunma sistemleri, oksidatif stres ve serbest radikal aracılı ortaya çıkan bu hasarı sınırlamaya yardımcı olmaktadır. Melatonin, epifiz bezi tarafından üretilen güçlü bir antioksidandır. Melatonin ve metabolitleri güçlü antioksidan/antiinflamatuvar özelliklere sahip olmasının yanı sıra enflamasyon ve oksidatif stres ile ilişkili çeşitli bozukluklarda oldukça etkili olduğu kanıtlanmıştır (Mayo ve ark., 2005). Melatonin, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit, tekli oksijen ve hipokloröz asit dahil olmak üzere birçok oksijen kökenli reaktif ajanı temizler. Melatonin peroksinitrit anyon ve/veya peroksinitöz asit ile reaksiyona girerek onları detoksifiye edebilir (Reiter ve ark., 2003). Melatonin amfifilik bir yapıda

olmasının avantajı ile antioksidan etkisini hem lipid hem de aköz ortamlarda gösterebilmektedir (Reiter ve ark., 2004).

Ayrıca, katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH) gibi enzimler, serbest radikallerin oluşumunu sınırlamaya ve oluşmaları nötralize etmeye yardımcı olur. Melatonin uygulaması, antioksidan rezervlerinin azaldığı gösterilen hipertansif modellerde (Anwar ve ark., 2001) ve klinikteki hipertansif popülasyonlarda (Masri ve ark., 2008) GSH, KAT ve SOD seviyelerini önemli ölçüde arttırmıştır (Anwar ve ark., 2001; Kozirog ve ark., 2011). Ayrıca, melatonin uygulamasından sonra antioksidatif savunma sistemlerindeki gelişmeler, düşük kan basıncı ve fenilefrin/noradrenalin gibi çeşitli kasılma ajanlarının oluşturduğu kasılma yanıtının inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir (Anwar ve ark., 2001).

Ahmadiasl ve arkadaşları, melatoninin, lipid peroksidasyon sürecinin göstergesi olan malondialdehit (MDA) üretiminde, lipid peroksidasyonunda ve hücrel hasarda azalmaya neden olduğunu bulmuşlardır (Ahmadiasl ve ark., 2014). Melatoninin bu koruyucu etkisi çok reaktif ONOO- ve OH'nin atılması ile gerçekleşmiş olabilir (Reiter ve ark., 1996).

2.8. Melatoninin Farklı Organ ve Hastalık Modellerinde NO/NOS Üzerindeki Etkileri

NO, hücre içinde NOS tarafından L-arginin kullanılarak sentezlenir (Nathan ve Xie, 1994). Artan kanıtlar melatonin uygulamasının, NOS gen ekspresyonunu ve NO üretimini düzenleyebileceğini göstermektedir.

2.8.1. Damarlar

Endotel hücreleri, NO'nun salınımı ile vasküler aktiviteyi düzenler, bu etki çözünebilir guanilat siklaz (sGC) aktivesi sonucu gevşetici etkiye sahip sGMP üretilmesi ile gerçekleşmektedir (Faraci ve Heistad, 1998). eNOS esas olarak endotel hücrelerde eksprese edilir. Endoteldeki NO yolunun uyarılması, melatonin tarafından yürütülen bölgesel ve/veya sistemik hemodinamik değişikliklere katkıda bulunur (Sigmon ve ark., 1995; Y. S. Chen ve ark., 2007). Örneğin melatonin, alkol kaynaklı böbrek hasarında eNOS ekspresyon paternini ve NO üretimini artırır (Sonmez ve ark., 2012). Melatoninin endotel vasküler fonksiyon üzerindeki koruyucu etkisi, yüksek yağlı diyetle beslenen

insüline dirençli fare aortunda (Sartori ve ark., 2009), kronik hipoksik sıçan akciğerinde (Hung ve ark., 2017), kardiyak mikrovasküler sistemde (Zhou ve ark., 2017) ve iskemi/reperfüzyonu (I/R) sonrası karaciğerde (S. W. Park ve ark., 2007) kanıtlanmıştır. Ek olarak, melatonin, kronik intermitant hipoksili sıçanlarda (Hung ve ark., 2013), yaşlı farelerde (Rodella ve ark., 2013) ve vasküler endotelial kültürlerinde (Nakao ve ark., 2013) NO seviyesini ve eNOS ekspresyonunu düzeltip, endotel disfonksiyonunu önler. Melatonin, iskemik beyin hasarında NOS ekspresyonunu düzenler ve eNOS'un hasara bağlı azalmasını önler (Koh, 2008). Çalışmalar, melatoninin, endotelial hücrelerde eNOS'un upregülasyonu aracılığıyla koruyucu etkilerini gösterdiğine dair kanıtlar sunmaktadır.

Yukarıdaki sonuçların aksine, melatoninin endotelial hücrelerde NO/eNOS'u inhibe ettiğini gösteren çalışmalar da vardır. Örneğin melatonin, sığır serebral arterlerinde hidrojen peroksit kaynaklı eNOS ekspresyonunu baskılar (Chucharoen ve ark., 2007). Ayrıca melatonin, mikrovasküler endotelial hücrelerde bradikininin indüklediği NO üretimini azaltır (Tamura ve ark., 2006; Silva ve ark., 2007).

2.8.2. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, ROS üretimi ve antioksidanlar adı verilen koruyucu mekanizmalarla ortadan kaldırılması arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir. Prooksidan / antioksidan homeostazdaki dengesizlik, hücrenin tüm bileşenlerine zarar verebilir (Reiter, 1991). Oksidatif stresin, birçok hastalığın patogeneğinde önemli bir rolü vardır. NO, ROS'un önemli bir bileşeni olan peroksinitrit (ONOO-) oluşturmak için süperoksit anyon radikalini (O_2^-) bağlayabilir. Nitroksidatif stres birçok patojenik süreçte yer alır. Melatonin güçlü bir antioksidan olarak kabul edilir ve NO yolağını modüle ederek oksidatif stresi azaltabilir.

NO'nun büyük kısmı, genellikle immünolojik veya enflamatuar stimulanlarla uyarılması sonucunda iNOS tarafından sentezlenir. Çok sayıda kanıt melatoninin, in vitro olarak sadece nöronlarda (Ananth ve ark., 2003), glial hücreler (Feng ve Zhang, 2004; Tocharus ve ark., 2008) ve makrofajlarda (Kang ve ark., 2013) değil, aynı zamanda I/R veya böbrek (Kurcer ve ark., 2007; Ersoz ve ark., 2009), beyin (Koh, 2008; Nair ve ark., 2011; Blanco ve ark., 2017) ve kalbin hipoksik hasarı (Dwaich ve ark., 2016), sepsis (Escames ve ark.,

2006; Ortiz ve ark., 2014), karaciğer (Taysi ve ark., 2003; Jung ve ark., 2009) ve periferik sinir (Chang ve ark., 2000) hasarı dahil farklı hastalık modellerinde NO üretimini ve/veya iNOS ekspresyonunu azalttığını göstermektedir.

Bütün olarak ele alındığında, sonuçlar melatoninin indüklenebilir NO üretimini inhibe ettiğini ve antioksidan etkiler sergilediğini göstermektedir (Karadayian ve ark., 2014).

2.8.3. Enflamasyon

iNOS ve NO, enflamatuar süreçte önemli bir faktör olarak kabul edilen çeşitli hücrelerde indüklenebilir (Lo Faro ve ark., 2014). Kanıtlar melatoninin NO regülasyonu aracılığıyla antienflamatuar etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Örneğin, melatoninin, karagenan (Bilici ve ark., 2002) ve zimosan ile aktifleştirilmiş plazma ile indüklenen lokal inflamasyon (Costantino ve ark., 1998), pankreatik sıvı kaynaklı akciğer iltihabı (C. F. Chen ve ark., 2011), yaşa bağlı inflamasyon (Rodriguez ve ark., 2007) ve yaraların akut inflamatuvar fazında (Pugazhenthii ve ark., 2008) iNOS ekspresyonu / aktivitesini inhibe edip NO üretimini azaltarak antienflamatuar etki gösterdiği düşünülmektedir. LPS, birçok güçlü immün yanıt ortaya koyabilir ve NO dahil birçok mediyatörü üretebilir. Melatonin, mikrogliyal hücrelerde (E. Park ve Chun, 2017) makrofajda (S. Zhang ve ark., 2004; Deng ve ark., 2006), endotel hücrelerinde (Tamura ve ark., 2009) ve vasküler düz kas hücrelerinde (Shi ve ark., 2012) LPS'nin neden olduğu NO/iNOS artışını önler. Ayrıca melatonin, primer sıçan beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde (Jumngprakhon ve ark., 2016), nöroblastom hücrelerinde (Valero ve ark., 2006) ve glial hücrelerde (Vilar ve ark., 2014) antienflamatuar etki gösterir. Anti-enflamatuar etkiler, iNOS ve NO üretiminin inhibisyonundan kaynaklanmaktadır.

2.9. Melatonin Aracılı NO Düzenleyici Mekanizmalar

2.9.1. Serbest Radikal Süpürme

Kanıtlar, melatoninin geniş spektrumlu bir antioksidan olarak çok etkili olduğunu göstermektedir. Melatonin, yüksek derecede toksik NO ve ONOO⁻ iyonunu doğrudan temizlemektedir (Tan ve ark., 2002). Yapı-aktivite ilişkisi analizlerine dayanılarak, melatonin molekülünün indol kısmı, yüksek rezonans stabilitesi ve serbest radikal reaksiyonlara karşı çok düşük aktivasyon enerji bariyeri nedeniyle oksidanlarla etkileşen reaktif merkezdir (Tan ve ark., 2002). Melatoninin NO süpürücü etkisi, in vitro insan

umbilikal arterlerinin endotelinde (Wakatsuki ve ark., 2001) kanıtlanmıştır; in vivo olarakta lokal inflamasyon modelinde onaylanmıştır (Cuzzocrea ve ark., 1997). Melatoninin serbest radikal süpürücü etkisi, en önemli antioksidasyon mekanizmalarından biridir.

2.9.2. MT Reseptörü

Melatoninin önemli etkilerine, iki membran reseptörü (MT1 ve MT2 reseptörü) ve diğer iki nükleer reseptörü (MT3 reseptörü ve RZR α / RZR β) içeren, spesifik reseptörlerinin aktivasyonu aracılık eder (Dubocovich ve Markowska, 2005; Mailliet ve ark., 2005). Melatonin, iNOS/NO gibi enflamatuar araçların düzeyini azaltır ve melatonin reseptörleri (MT1/2) aracılığıyla beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde enflamatuar yanıtları önler (Jumnongprakhon ve ark., 2016). Ayrıca melatonin, vasküler endotelial hücre kültüründe, inhibe edilmiş eNOS fosforilasyonunu melatonin reseptörü aracılığıyla düzeltir (Nakao ve ark., 2013). Başka bir çalışma, melatoninin metabolik sendromlu sıçanlarda eNOS protein ekspresyonunu artırabildiğini göstermektedir, bu da MT1 reseptörü varlığıyla ilişkili olabilir (Klimentova ve ark., 2016).

2.9.3. L-Arginin Metabolizması

L-Arginin, hem NOS hem de arginazın substratıdır. İn vivo çalışmalar, melatoninin, arginaz aktivitesini arttırarak, beyindeki NO üretimi için arginin mevcudiyetini sınırlandırarak, deneysel subaraknoidal kanamada (Aladag ve ark., 2009) ve rabdomiyolizi takiben böbrekte (Aydogdu ve ark., 2006) NOS aktivitesini azalttığını göstermektedir. Ayrıca melatonin, glokom modelinde retina (Saenz ve ark., 2002) ve retinal ganglion hücrelerinde (Belforte ve ark., 2010) gözlenen, NOS aktivitesini inhibe edip hücreye L-arginin alımını azaltmıştır. Spontan hipertansiyon NO eksikliği ile ilişkilidir. Melatonin, L-arginin mevcudiyetindeki artışa bağlı olabilecek bir mekanizma ile NO'ü düzenleyip, kan basıncında artışa karşı koruma sağlar (Tain ve ark., 2010).

2.9.4. NF- κ B

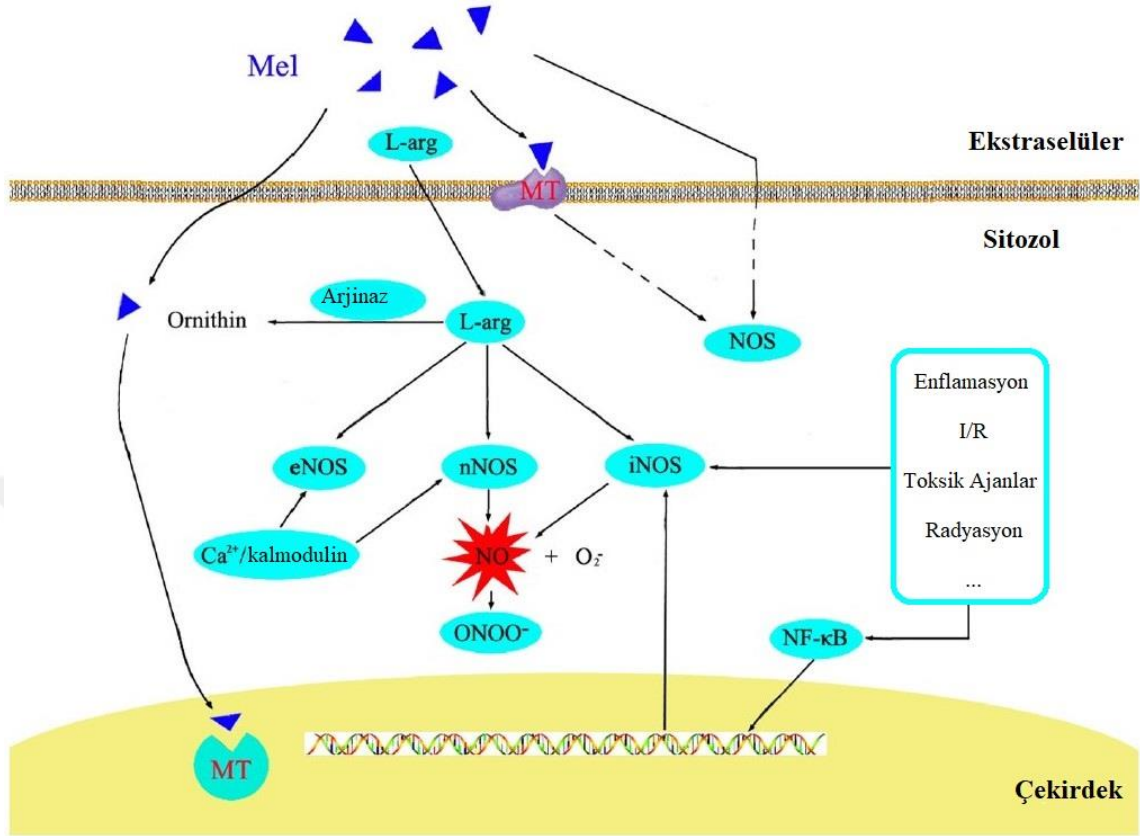
Bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-kappa B (NF- κ B), bağışıklık yanıtlarını kontrol eden çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenler, bu da stresin hücrel adaptasyonunda ortak yolaktır. NF- κ B'nin aktivasyonu, iNOS transkripsiyonunun ana mekanizmalarından biridir. Kanıtlar melatoninin, NF- κ B aktivasyonunun inhibisyonuyla,

iNOS ve NO ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermektedir. Etkiler diyabetik retinopati (Jiang ve ark., 2016), karaciğer hasarı (Jung ve ark., 2009), I/R kaynaklı böbrek fonksiyon bozukluğu ve tübüler hasar (Z. Li ve ark., 2009) gibi çeşitli patolojilerde görülür. Ayrıca, LPS ile uyarılmış makrofajlar (Gilad ve ark., 1998; S. Zhang ve ark., 2004) ve mikrogial hücrelerdeki (E. Park ve Chun, 2017) etkilerini gösteren birçok in vitro çalışma vardır.

2.9.5. Ca²⁺/Kalmodulin

nNOS ve eNOS izoformları yapısal olarak eksprese edilir ve enzim aktivasyonu Ca²⁺/kalmodulin bağımlı sinyal yolağının uyarılması ile gerçekleşir. Böylece, melatonin Ca²⁺/kalmodulin ile etkileşime girerek NO üretimini değiştirmek için nNOS/eNOS'u düzenleyebilir. Örneğin melatonin, serebellum (Pozo ve ark., 1997) ve striatumda (Leon ve ark., 2006) kalmodulin ile kompleks oluşturarak temel NOS aktivitesini inhibe eder ve in vitro bir çalışmada melatoninin, NOS aktivitesini önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur, bu kalmodulin etkisiyle oluşmuş olabilir (Bettahi ve ark., 1996). Ayrıca melatonin, mikrovasküler endotel hücrelerde bradikinin tarafından indüklenen NO üretimini azaltır; buradaki olası mekanizma, Ca²⁺/kalmodulinin NOS üzerindeki inhibisyon etkisidir (Tamura ve ark., 2006; Silva ve ark., 2007).

Yukarıda belirtildiği gibi melatonin, in vivo ve in vitro NO/NOS regülasyonu üzerinde farklı etkileri vardır. Deneysel ve klinik veriler, melatoninin zararlı uyarılara karşı hücre/organ hasarını önlediğini veya azalttığını göstermektedir. Melatonin, NO/NOS'u, farklı organlarda ve hastalıklarda, farklı mekanizmalarla düzenleyebilir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Melatoninin NO/NOS üzerine etkisinin olası mekanizmaları

2.10. Melatonin ve Kardiyovasküler Hastalıklar

2.10.1. Kardiyovasküler Hastalık İle İlişkili Olarak Melatonin Düzeylerinin Azalması

Klinik olarak, kardiyovasküler hastalık (KVH) patofizyolojisinde melatoninin giderek daha fazla söz edilmeye başlanmıştır. Koroner kalp hastalığı, anjina, konjestif kalp yetmezliği ve miyokard infarktüsü gibi çeşitli KVH'lerde, serum melatonin ve uriner metaboliti olan 6-sülfatoksimeleatonin (aMT6) seviyelerinin düşük olduğu bildirilmiştir.

Melatoninin anti-enflamatuar ve antioksidan özellikleri sayesinde hipertansiyona karşı koruyucu olduğu bilinmektedir (Cheng ve ark., 2014; Klimentova ve ark., 2016; Hung ve ark., 2017). Chern ve arkadaşları, Melatoninin iskemik inmede beyin fonksiyonlarında iyileşmeye ve nörolojik defisit azalmaya neden olduğu, inflamasyon ve oksidatif stresi azalttığı, ayrıca farelerde kan-beyin bariyeri bütünlüğünün sağlanmasında etkili olduğuna dair kanıtlar bulmuşlardır (Chern ve ark., 2012). Pechanova ve arkadaşları, Melatoninin

hipertansiyondaki endotel fonksiyonu koruyucu etkisini radikal yükü ve iltihabı azaltarak gerçekleştirdiğini bulmuşlardır (Pechanova ve ark., 2014). Reiter ve arkadaşları, Melatoninin antioksidan enzimleri aktive edip reaktif oksijen ve azot türlerinin detoksifiye olmasını sağlayarak inme ve kalp krizlerini düzelttiğini göstermiştir (Reiter ve ark., 2016). Melatonin kaynaklı bu etkiler, hormonun kardiyovasküler kaynaklı bozukluklarda potansiyel terapötik ajan olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

Melatoninin kan basıncı (KB) üzerindeki etkilerinin, ET, Ang II ve NO gibi birçok faktörün etkileşimi ile gerçekleştiğine inanılmaktadır (Paulis, Pechanova, Zicha, Liskova, ve ark., 2010; Su ve ark., 2016). Bu araştırmacılar melatoninin KB'yi ET, Ang II ve NO düzeylerine olan etkileri aracılığıyla düzenlediğini göstermişlerdir; ancak KB üzerindeki bu hormonal etkilerin altında yatan moleküler mekanizmalar aydınlatılamamıştır.

Pechanova ve arkadaşları, melatoninin endotel disfonksiyonunu iyileştirerek hipertansiyonu hafiflettiğini bulmuşlardır (Pechanova ve ark., 2014). Hipertansiyonda oksidan süreçler önemli rol oynamaktadır. Hipertansiyonda NO ve eNOS protein ekspresyonu azalır. Melatonin tedavisi sonucunda NO seviyeleri normale döner, eNOS protein ekspresyonu artar, antioksidan enzim aktiviteleri uyarılır ve toksik hidroksil radikallerinin oluşumu azalır (Cheng ve ark., 2014; Klimentova ve ark., 2016; Reiter ve ark., 2016). HUVEC'ın MLT ile inkübasyonu sonucunda NO seviyeleri ve eNOS protein ekspresyonu artmıştır. Oksidan değişikliklerin daha önce ortaya çıktığı göz önüne alındığında, antihipertansif tedavide oksidasyonun daha hassas bir belirteç olabileceği düşünülebilir.

2.10.2. Kardiyovasküler Sistem

Yakın geçmişte miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı (MI/R), miyokardiyal hipoksi-reoksijenasyon hasarı, hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon, ateroskleroz, kalp kapak hastalıkları ve diğer kardiyovasküler hastalıklar gibi kardiyovasküler hastalıklarda (KVH) melatoninin kardiyoprotektif etkilerini bulmak için bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların birçoğu, melatoninin KVH'lar için ucuz ve iyi tolere edilen bir adjuvan kardiyovasküler ilaç olarak geliştirilebileceğini ortaya koymaktadır (Reiter ve ark., 2010; Yu ve ark., 2016).

Son zamanlarda yapılan alışmalar MI/R hasarında, melatoninin yararlı olduğunu göstermiştir. Yu ve arkadaşları, melatoninin MI/R hasarında miyokardiyal endoplazmik retikulum (ER) stresini ve apoptozunu azaltabildiğini göstermiştir (Yu ve ark., 2016). Nduhirabandi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da melatoninin, tümör nekroz faktör alfa (TNFa) ve sinyal transdüser ve aktivatör transkripsiyon 3 (STAT3) yolunun aktivasyonu aracılığıyla MI/R hasarını önlediğini bildirmiştir.

Miyokard disfonksiyonu, sepsisin önemli bir göstergesidir ve melatoninin sepsise karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir. PI3K / Akt sinyal yolağı aktivasyonunun sepsiste yararlı olduğu bildirilmiştir. Bir çalışmada, melatoninin PI3K / Akt sinyal yolu aktivasyonu aracılığıyla sepsiste oluşan miyokard hasarını hafiflettiği bulunmuştur (An ve ark., 2016). Chua ve ark, yaptığı çalışma melatoninin, kardiyorenal sendromlu (KRS) sıçan modelinde kardiyoprotektif etkisinin olduğunu göstermiştir. Çalışma, melatonin ve eksendin-4 kombinasyon tedavisinin sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu ve sol ventriküler remodelingde KRS kaynaklı bozulmayı baskıladığını göstermiştir (Chua ve ark., 2016). Melatoninin, MI sonrası kardiyak disfonksiyonu önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur ayrıca artan otofajiyi, azalan apoptozu, mitokondriyal disfonksiyonu hafifleterek advers sol ventrikül remodelingini azaltmıştır.

2.10.3. Koroner Kalp Hastalığı (KKH)

Sağlıklı kontrol ve KKH hastalarında yapılan bir çalışmada, gece serum melatonin düzeyinin KKH hastalarında kontrollere göre 5 kat daha düşük olduğu bulunmuştur (Brugger ve ark., 1995). Benzer şekilde, koroner arter hastalığı (KAH) olan 16 hastanın, 22:00 ve 08:00 arasında her 2 saatte bir kanları alınmış ve KAH olanların kontrollere kıyasla sabah 2, sabah 4 ve sabah 8'de melatonin düzeylerinin daha az olduğu bulunmuştur (Yaprak ve ark., 2003). 18 kontrol ve 48 erkek KKH hastasında, gece idrar aMT6 düzeyleri kontrol edildiğinde hasta grupta aMT6 düzeylerinin anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur (Sakotnik ve ark., 1999). Son olarak, stabil ve kararsız anjina hastalarında, koroner hastalarda (KH) ve sağlıklı kontrollerde üriner aMT6 düzeyleri karşılaştırıldığında, kararsız anjinası olan hastaların nokturnal üriner aMT6 düzeylerinin, hem sağlıklı kontrollere hem de stabil anjinası olan hastalara göre anlamlı olarak daha düşük olduğu bulunmuştur. Buna karşılık, düşük seviye KH'li hastalarda anlamlı olarak

bir fark bulunmamıştır (Girotti ve ark., 2000). Sonuçlar, düşük melatonin üretiminin, kararsız anjinada olduğu gibi, yüksek kardiyak infarktüs ve/veya ölüm ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

2.10.4. Konjestif Kalp Yetmezliği (KKY)

Ciddi KKY'li 33 hasta ve 146 sağlıklı kontrolün idrarında aMT6 seviyeleri ölçüldüğünde, KKY hastaların idrarındaki aMT6 seviyesinin önemli ölçüde düşük olduğu bulunmuştur. Kronik ve akut KKY hastaları arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Girotti ve ark., 2003). KKY'de azalan melatonin üretimini açıklayan mekanizmalar aydınlatılmış olsa da, araştırmacılar melatonin üretimi ile sempatik reseptör aktivitesi ve norepinefrin ko-transmitteri olan nöropeptit Y arasında çok yönlü bir etkileşim olduğunu öne sürmektedir. Ayrıca, melatonin üretiminin, vazopressin, prostaglandinler ve kalsitonin geni ile ilişkili peptit gibi maddelerin KKY hastalarındaki artışı ile ilgili modülatör bir rolünün olduğunu ileri sürmektedir (Girotti ve ark., 2003).

2.10.5. Miyokard İnfarktleri (MI)

Primer perkütan koroner girişim (PPKG) uygulanan ST segment elevasyonlu miyokard infarktüsü (STEMI) olan 180 hastada intraplatelet melatonin düzeyleri karşılaştırılmıştır. PPKG sonrası hastaların %35'inde anjiyografik no-reflow gözlenmiştir. Koroner arterde ileri doğru akım sağlanmış olmasına rağmen miyokard dokusunda yeterli perfüzyon sağlanamaması durumu “no-reflow” olarak tanımlanmaktadır. Anjiyografik no-reflow olan hastalar, no-reflow olmayan hastalara kıyasla daha düşük intraplatelet melatonin düzeylerine sahiptir. Ek olarak regresyon analizi, intraplatelet melatonin düzeylerinin MI sonrası anjiyografik no-reflow'un tek belirleyicisi olduğunu göstermiştir (Dominguez-Rodriguez ve ark., 2010).

Genel olarak, yukarıda belirtilen çalışmaların bazılarının sınırlı sayıda hastaya sahip olduğu düşünülse de, çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda melatoninin azaldığına dair açık ve güçlü kanıtlar vardır. Bununla birlikte, azalan melatonin düzeylerinin bu tür durumların nedeni mi yoksa sonucu mu olduğunu belirlemek için daha büyük klinik popülasyona sahip büyük ölçekli çalışmaları içeren araştırmalara ihtiyaç vardır.

2.11. Kan Basıncının Düzenlenmesinde Melatonin Mekanizmaları

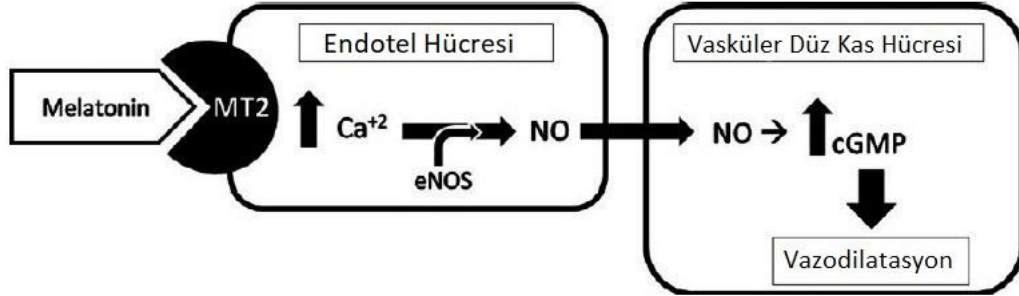
Melatoninin vazodilatör ve hipotansif etkilerini destekleyen çok sayıda kanıt olmasına rağmen, bu sonuçların reseptör stimülasyonu kaynaklı olup olmadığı açıklanamaz. Daha önce belirtildiği gibi, melatonin reseptörleri Gi- ve Gq-reseptör aktivasyonuna bağlıdır, bu da sAMP seviyelerinde düşüşe ve sitosolik kalsiyum seviyelerinde artışa neden olur. Bunun sonuçları, sırasıyla vazodilasyonun inhibisyonuna ve/veya vazokonstriksiyona neden olacaktır. Bir başka açıklama ise melatoninin, vasküler düz kas hücrelerinde konsantrasyona bağlı iki karşıt yanıtta aracılık etmesidir. Düşük konsantrasyonlarda melatonin kasılmaları güçlendirir, yüksek konsantrasyonda kasılmaları azaltır (Doolen ve ark., 1998). Bu kısmen, gece boyunca melatonin konsantrasyonları yüksek olduğundan, meydana gelen kan basıncındaki doğal düşüşü açıklamaktadır.

Bununla birlikte, altta yatan gerçek mekanizma muhtemelen çok yönlüdür ve bu paradoks MT2 reseptör aktivasyonunun endotelial hücreler üzerindeki etkisi sonucunda gerçekleşen NO üretiminde artışla açıklanabilir. Ek olarak, hipertansiyon gelişimine yol açan başlıca mekanizmalar, oksidatif stres ve reaktif oksijen ve azot türlerinin varlığıdır. Melatonin, oksidatif stresi doğrudan ve dolaylı olarak azaltabilen güçlü bir antioksidandır. Son olarak, melatoninin kan basıncı üzerindeki hipotansif etkilerinin merkezi otonomik mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştiğini destekleyen kanıtlar da vardır.

2.11.1. Endotel Bağımlı Vazodilatasyon

Melatonin, iki ana yolak ile vazodilatasyona neden olduğu varsayılır: direkt kalsiyum kanalının bloke edilmesi ve buna bağlı olarak endotel bağımlı NO ve sGMP'deki artışlar. Satake, melatoninin inhibitör etkisinin verapamile benzer olduğunu ve melatoninin vazokonstriksiyonu önlemede kalsiyum kanal blokerlere benzer etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Ek olarak, melatoninin vazodilatör etkileri de kısmen endotel bağımlıdır ve sGMP üretimindeki artışla ilişkilidir (Satake ve ark., 1991). MT2 melatonin reseptör aktivasyonu sonucu gerçekleşen endotel bağımlı vazodilatasyon, birçok çalışmayla desteklenmiştir. Girouard, melatonin uygulaması sonrasında mezenterik arterlerde gerçekleşen gevşemenin maksimum olduğunu ve asetilkolinin aort üzerindeki vazodilatör etkisinin arttığını göstermiştir. Endotel bağımlı bu yanıt vasküler NOS aktivitesinin artmasına aracılık eder. NOS yolu aktivasyonu, NOS inhibitörü varlığında hipotansif

etkilerin ortadan kalkması ile kanıtlanmıştır (Girouard ve ark., 2001). Son olarak, melatonin, hipertansiyon ve serbest radikallerin aşırı üretimi sonucu internal kalsiyum sinyalinin etkilendiği endotel hücre disfonksiyonu modelinde serbest radikallerin kalsiyum salınımı üzerindeki zararlı etkilerini tersine çevirmiş ve endotel hücrelerdeki internal kalsiyum sinyalini düzenlemiştir (Pogan ve ark., 2002). Bu nedenle, endotel bağımlı vazodilatasyonda önerilen mekanizmada: NOS yolğunın uyarılıp hücre içi kalsiyumun arttırılması ile NO'nun üretiminde artışa neden olan sinyal kaskadını başlatmak için endotelyal hücreler üzerinde MT2 reseptörünün aktive olması gerekmektedir. NO ayrıca döngüyü tamamlamak ve vazodilatasyonu uyarmak için sitosolik guanilat siklazı aktive eder ve vasküler düz kasta sGMPyi artırır (Şekil 2.4.). Genel olarak, hücrel NO yolaklarının, melatoninin antihipertansif etkilerinde önemli bir rolünün olduğu görülmektedir (Paulis, Pechanova, Zicha, Barta, ve ark., 2010).



Şekil 2.4. Melatonin aracılı endotel bağımlı vazodilatasyon mekanizması

Bu çalışmaların çoğunluğu in vitro izole damar ve hücreleri içermekle birlikte, insanlarda yapılan çalışmalarda, melatoninin vazodilatatör etkisini gösteren sonuçlar bildirilmiştir (Cagnacci ve ark., 1998; Yıldız ve ark., 2006). Ayrıca, ekzojen melatonin uygulaması, distal arteriyel damarların seçici vazodilatasyonu ve periferik kan akışındaki artış sonucunda vücut ısısında bir azalmaya neden olmaktadır (Krauchi ve ark., 1997).

Melatoninin antihipertansif etkilerinin olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (Simko ve Paulis, 2007; Pechanova ve ark., 2014). Klinik çalışmalarda, koroner arter hastalıkları, arteriyel hipertansiyon ve konjestif kalp yetmezliği olan hastalarda melatonin seviyeleri düşük bulunmuştur ve melatonin tedavisinin nokturnal hipertansiyonu, sistolik ve

diyastolik kan basıncını, trombosit agregasyonunu, serum katekolamin düzeylerini ve internal karotid arterde pulsatilite indeksini azalttığı bulunmuştur (Pandi-Perumal ve ark., 2017). Sempatik ve parasempatik sistem arasındaki dengesizliğin patofizyolojik bozukluğa katkıda bulunduğu bilinmektedir ve bu dengesizlikleri düzeltmek için kullanılan ilaçlar hipertansiyonda terapötik hedef olarak kabul edilmektedir. Melatonin, serbest radikalleri süpürme, endotelial disfonksiyonu iyileştirme, inflamasyonu azaltma ve parasempatik sistemi destekleyen sempatik ve parasempatik sistem arasındaki dengesizliği düzelterip hipertansiyonu tedavi edebilme gibi yararlı etkilere sahiptir (Pechanova ve ark., 2014).

Yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlar ve indüklenmiş diyabetik sıçanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada melatoninin endotel fonksiyonunu ve vasküler yanıtları tersine çevirdiği bildirilmiştir (Salmanoglu ve ark., 2016). Üç damarında koroner hastalığı olan 39 hasta (32 erkek ve 7 kadın) üzerinde çift-kör, randomize, kontrollü yapılan bir çalışmada, melatoninin şiddetli ve ilerlemiş aterosklerozlu hastalarda bile endotelial oksidatif stres üzerinde yararlı etkilerinin olduğu ortaya konmuştur (Javanmard ve ark., 2016).

Bu nedenle, artan serum melatonin seviyesinin bazı hipertansiyon türlerinde, sempatik aşırı uyarılmaya karşı düzenleyici mekanizma olabileceğine ve melatoninin organ koruması ve minimal yan etkilerle dahil olmak üzere çeşitli hipertansif parametrelerde olumlu etkilerinin olduğu bildirilmektedir, bu yüzden kardiyovasküler patolojilere karşı mücadelede aday önemli bir ilaç olarak adlandırılabilir.

2.12. Melatonin ve Endotel Disfonksiyonu

Araştırmalar, endotel disfonksiyonunun NO ve ET-1 ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Javeshghani ve ark., 2013). Risbano ve Gladwin, vazodilatör sistemlerinin düzensizliğinin büyük ölçüde NO yolağı üzerinden gerçekleştiğini ve hemen hemen her adımın bozulmaya maruz kaldığını bildirmiştir (Risbano ve Gladwin, 2013). Bu düzensizliğe, eNOS fonksiyonunda azalma, eNOS'un enzimatik 'ayrılması', NO'nun süperoksit ve hücresiz hemoglobin ile bağlanmasında artma, endojen rekabetçi eNOS inhibitörlerinin (asimetrik dimetilarginin, ADMA) artması ve NO'nun moleküler hedefi olan çözümlü guanilil siklazın oksidasyonu dahildir.

Endotelyal NOS, endotel fonksiyonu için gereklidir ve vasküler endotel patofizyolojisine karşı önemli bir koruyucudur. eNOS'un upregülasyonu, kan akışını artırarak endotelin koruyucu mekanizmasına destek olur (Marletta, 1994; Albrecht ve ark., 2003). Melatonin, eNOS mRNA seviyelerindeki artışı indüklerken, iNOS mRNA seviyelerindeki artışı azaltmıştır. Diğer çalışmalar, melatoninin iNOS inhibe edip, eNOS'un aktivasyonunu arttırarak iskemik yaralanmalara karşı koruyucu olduğunu göstermiştir (Kilic ve ark., 2005; W. Z. Wang, Fang, ve ark., 2005). Bu sonuçlar melatonin ön tedavisinin NO biyoyararlanımını arttırıp ve endotelin ekspresyonunu azalttığına dair bulguları desteklemektedir (W. H. Zhang ve ark., 2006).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma in vivo hayvan modeli sonrasında melatoninin etki mekanizmasının anlaşılabilmesi için yapılması planlanan bir seri deneysel aşamadan oluşmaktadır. Bu basamaklar aşağıda özetlenmiştir.

3.1. Deney Modeli

Çalışmamızda 200-250 gram ağırlığında toplam 60 adet erkek sıçan kullanıldı.

Gruplar aşağıdaki gibi dizayn edilmiştir:

1. KONTROL GRUBU: Normal içme suyu ile beslenen gruptur.
2. MGO MARUZİYETİ YAPILAN GRUP: Sıçanların içme suyuna 3 ay süreyle günde 75 mg/kg dozda MGO ilave edildi. Bu doz hayvanların günlük olarak tükettiği su miktarına göre hesaplandı.
3. MGO + MELATONİN UYGULANAN GRUP: MGO bir önceki grupla aynı doz ve sürede içme suyuna eklenirken beraberinde günde tek doz intraperitoneal olarak 10 mg/kg dozda (0.1 ml) melatonin uygulandı.
4. MGO + TAŞIYICI GRUBU: MGO aynı doz ve sürede uygulanırken intraperitoneal olarak aynı hacimde (0.1 ml) melatonin'in içinde çözüldüğü %2'lık EtOH taşıyıcı olarak uygulandı ve sonra distile su ile dilüe edildi.

Sıçanlar, 3 aylık süre sonunda ketamin ve ksilazin anestezisi altında önce abdominal aorttan kanları alındı ve sonra dekapite edilerek torasik aortları çıkartıldı. Aortlar etraf dokulardan dikkatle temizlendikten ve arter halkaları 2-3 mm uzunluğunda kesildikten sonra organ banyosuna yerleştirildi.

3.2. Organ Banyosu

Elde edilen aort halkaları damar lümeni zedelenmeden dikkatlice iki paslanmaz çelik klipten geçirilerek taze Krebs solüsyonu (mM: NaCl 118, KCl 5, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.0, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5 ve glikoz 11.2) ile dolu 20 ml'lik organ banyosunda pH

7.4 olacak şekilde %95 O₂ ve %5 CO₂ ile gazlanması sağlanarak 37°C’de dinlenmeye alındı. İzometrik gerilim; bir bilgisayar-tabanlı veri toplama sistemine (MP36, Commat Ltd, Ankara, Türkiye) bağlı bir izometrik kuvvet dönüştürücü (FDT10-A, Commat Ltd, Ankara, Türkiye) ile sürekli ölçüldü. Torasik arter halkalarına 2 g optimal bir dinlenme gerginliği uygulanıp dokular 60 dakika süre boyunca dengelemeye bırakıldı.

3.3. Protokol

Deneylerin ilk kısmında, tüm gruplarda KCl (80 mM) ve fenilefrin (10^{-9} - 10^{-5} M) ile kasılma yanıtları alındı. Daha sonra fenilefrin ile kasılmış endoteli sağlam torasik arter halkalarının ACh (endotel bağımlı, ACh, 10^{-9} - 10^{-5} M) ve sodyum nitroprusid (SNP, endotelden bağımsız, 10^{-13} - 10^{-6} M) ile gevşeme yanıtları alındı. L-NAME inkübasyonu sonrası ACh gevşeme yanıtları tekrar edildi.

3.4. Biyokimyasal Parametreler

Hayvanlar sakrifiye edilmeden hemen önce aortlarından alınan kanlarda; biyokimyasal parametreler değerlendirildi. Tüm gruplardan elde edilen kan örnekleri santrifüj edilip ve sonrasında örneklerden total kolesterol, trigliserid, HDL-kolesterol ve LDL-kolesterol ölçümleri uygun kitler aracılığıyla ELIZA yöntemiyle değerlendirildi.

3.5. İmmünohistokimyasal Analizler

3.5.1. Doku Takibi ve Kesitlerin Alınması

Çalışmada erkek sıçanlar sakrifiye edildikten sonra torasik aort parçaları immunohistokimyasal analizler için %10’luk formaline alındı ve 24 saat fiksatifte bekletildi. 1 günün sonunda dokulardan fiksatifi uzaklaştırmak için 3 saat akarsuda yıkandı. Suyu uzaklaştırmak için %70, %80 ve %90 artan alkol serilerinde birer gün bekletildi. %100’lük alkolde 3 saat bekletilen dokular daha sonra şeffaflaştırma aşaması için temiz ksilole (Interlab; # 990-019-2501) alındı. Temiz ksilolde 30 saniye bekletilerek alkolün dokudan çıkarılması ile şeffaflaştırma işlemi tamamlandı. Ardından dokular 56°C’ye ayarlanmış etüvde sıvı parafin serilerinden geçirilip, toplamda 3 saat ksilolün parafinle dokudan yer değiştirmesi sağlandı ve dokular temiz parafine gömüldü.

İmmünohistokimya boyaması ve tünel metodu için parafine gömülen dokular bloklar halinde mikrotom cihazında (Leica; #RM2125RT) kesit alma işlemi için hazırlandı ve

Şım kalınlığındaki kesitler Poly-L-Lizin'li lamlara (Thermo Fisher; #10143265) alındı. Alınan kesitler gece boyu 60°C etüvde bekletilerek lama yapışmaları sağlandı.

3.5.2. İmmünohistokimyasal deneyler

Gömülen aortlardan seri kesitler alınarak aortun tunika intima tabakasında yer alan endotel hücrelerinin durumu gruplar arasında değerlendirildi. MGO ile endotel disfonksiyonuna bağlı eNOS ve p-eNOS ekspresyonları ile; hasar sonrası uygulanan melatoninin endotel hücreleri üzerindeki etkisi değerlendirildi.

- Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (eNOS),
- Fosforile Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (p-eNOS),
- Apoptoz belirteci Cleaved kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyonları endotel hasarını değerlendirmek için seçildi.

Deparafinizasyon aşaması için, parafin kesitler 2 defa 10'ar dakika ksilolden geçirildi. Kesitler daha sonra azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70) 5'er dakika bekletildi. Distile su ile 5 dakika muamele edildi. Dokudaki antijenik epitoplara ortaya çıkması için kesitler, sitrik asit tamponu (Merck; #1.00244.1000) (pH:6,0; 900 ml distile suda 2,1 gr sitrik asit) içine alınarak 1 defa 7 dakika mikrodalga fırında 750 watta tutuldu. Mikrodalga uygulamasından sonra kesitler sitrik asit içerisinde 20 dakika boyunca oda ısısında soğutuldu. Kesitler fosfat tamponuna (PBS) alınıp 3 kere 5'er dakika yıkandıktan sonra dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini yok etmek için metanolla (Merck; #1.06009.2511) hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit (Merck; # 1.08600.1000) solüsyonunda 15 dakika bekletildi. Ardından, kesitler 3 defa 5'er dakika PBS'ten geçirildi. Dokuların çevresi hidrofobik kalemle çizildi ve özgül olmayan antikor bağlanmasını önlemek amacıyla, bloklama solüsyonu (Thermo; #TA-125-UB) ile 7 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Serum kesitler üzerinden uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlarla aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün tekrar PBS ile 3 kez 5 dakika yıkanıp, biyotinli sekonder antikorlar ile 1 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 3 defa 5 dakika PBS ile yıkandı ve streptavidin-peroksidaz kompleksi (Invitrogen; #85-9043) ile 40 dakika inkübe edildi. İnkübasyonu

takiben PBS ile yıkama sonrasında da Diaminobenzidin (DAB) substrat kromojen solüsyonu damlatılarak enzim substrat ilişkisi sonucunda reaksiyon bölgelerinin kahverengi olması beklendi. Bu basamak slaytları suya almak kaydıyla durduruldu. Kesitlere Mayer hematoksileninde (Merck; #1.09249.1000) zıt boyama yapıp, ardından entellan (Merck; #1.07961.1000) ile kapatıldı. Işık mikroskobu düzeyinde torasik aortta eNOS, p-eNOS ve Cleaved kaspaz-3 proteinlerinin dağılımları ve immünoreaktivite dereceleri tespit edilip fotoğraflandırıldı.

Tablo 3.1. Kullanılan antikorlar:

<i>Antikorlar</i>	<i>Marka-Katalog no</i>	<i>Primer antikor</i> (+4 / -20°C)	<i>Sekonder antikor(+4°C)</i>
Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (eNOS)	Santa cruz sc-654	Rabbit polyclonal (1:100 µL) (+4°C)	Anti-rabbit (1:500 µL)
Fosforile Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (p-eNOS)	Santa cruz sc-12972 (Ser 1177)	Goat polyclonal (1:100 µL) (-20°C)	Anti-goat (1:500 µL)
Cleaved kaspaz-3	CELL SIGNALING- 9661L	Rabbit polyclonal(1:50 µL) (-20°C)	Anti-rabbit (1:400 µL)

3.6. Tünel Floresan Yöntemi

Deparafinizasyon aşaması için, parafin kesitler 10 dakika ksilolden geçirildi. Kesitler daha sonra azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70) 3'er dakika bekletildi ve distile su ile 3 dakika muamele edildi. %0.1'lik Triton x-100 (Sigma; #9002-93-1), %0.1'lik sodyum sitrat (Merck; #106432.5000) ve distile su ile hazırlanan Permeabilizasyon solüsyonu şaleye alındı ve şaledeki slaytlar 8 dakika buz üzerinde inkübe edildi. PBS ile 2 kez 5 dakika yıkayıp permeabilizasyon solüsyonu uzaklaştırıldı. Daha sonra TUNEL (reagent) solüsyonu hazırlandı (In Situ Cell Death Detection Kit-TMR red, Roche; #12 156 792 910). Enzim eklenen pozitif kontrol solüsyonu ve enzim eklenmeyen negatif kontrol solüsyonu dokular üzerine damlatıldı ve 37°C etüvde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası PBS ile 2 kez 5 dakika yıkanan slaytlar DAPI'li kapama solüsyonu (Antifade Mounting Medium with DAPI, Vector; H-1200) ile kapatıldı ve floresan mikroskopta fotoğraflandırıldı.

3.7. İlaçlar

Asetilkolin klorür, L-fenilefrin hidroklorür, sodyum nitroprussid, melatonin ve MGO kullanıldı. Tüm ilaçlar ve Krebs solüsyonu için gerekli kimyasallar Sigma Chemical (St.Louis, MO., ABD)'den satın alındı. Bütün deneyler boyunca ilaçlar günlük olarak taze hazırlandı. Melatonin hariç tüm ilaçlar distile suda çözüldü. Melatonin önce %2'lik etanolde çözüldükten sonra distile su ile dilüe edildi.

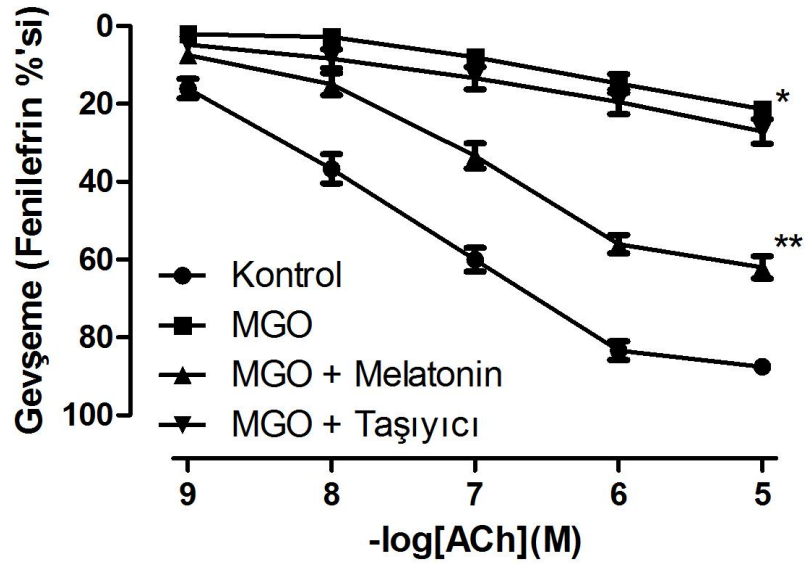
3.8. İstatistiksel Analizler

Tüm değerler ortalama \pm standart hata (SEM) şeklinde ifade edildi. ACh veya SNP yanıtları Fe ile oluşan kasılma yanıtına göre % gevşeme yanıtı olarak ifade edildi. Fe ile oluşan kasılma yanıtları 80 mM KCl yanıtlarının yüzdesi olarak verildi. Gruplar arasındaki fark tek yönlü ANOVA ile analiz edildi. P değeri 0.05'den düşük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Asetilkolin ile Oluşan Endotele Bağımlı Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Kontrol grubu sıçanlardan elde edilen torasik aort preparatlarında ACh konsantrasyona bağlı bir gevşeme yanıtı oluşturdu (Şekil 4.1). 12 hafta süreyle MGO maruziyeti olan hayvanlardan elde edilen damarlarda ise ACh'e bağlı gevşeme yanıtının anlamlı olarak inhibe olduğu görüldü. MGO maruziyetine bağlı olarak ACh aracılı gevşeme yanıtlarındaki azalma yanıtı sıçanlara MGO ile birlikte melatonin uygulanmasıyla anlamlı olarak düzeldi. Taşıyıcı ve MGO alan grupta ise MGO grubuna göre ACh gevşeme yanıtları anlamlı olarak değişmedi.

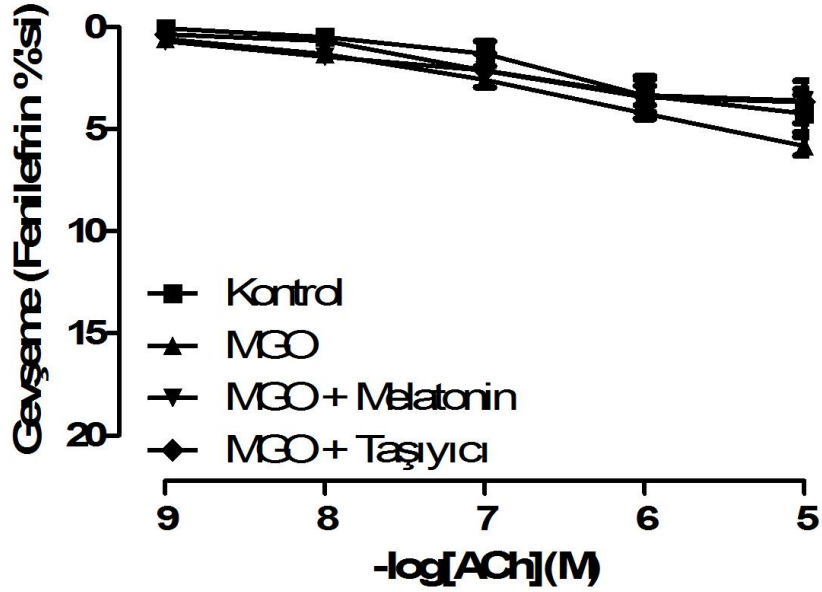


Şekil 4.1. Torasik aort halkalarında ACh ile oluşan konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtı. *p<0.05 kontrole göre, **p<0.05 MGO'ya göre anlamlı.

4.2. L-Name İnkübasyonu Sonucunda Asetilkolin ile Oluşan Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Kontrol grubu sıçanlardan elde edilen torasik aort preparatlarında L-NAME inkübasyonu ACh ile elde edilen konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtında anlamlı bir azalmaya neden oldu (Şekill 4.2). 12 hafta süreyle sadece MGO, MGO+ Taşıyıcı veya MGO + Melatonin uygulanan hayvanlardan elde edilen damarlarda ise L-NAME inkübasyonu sonrası

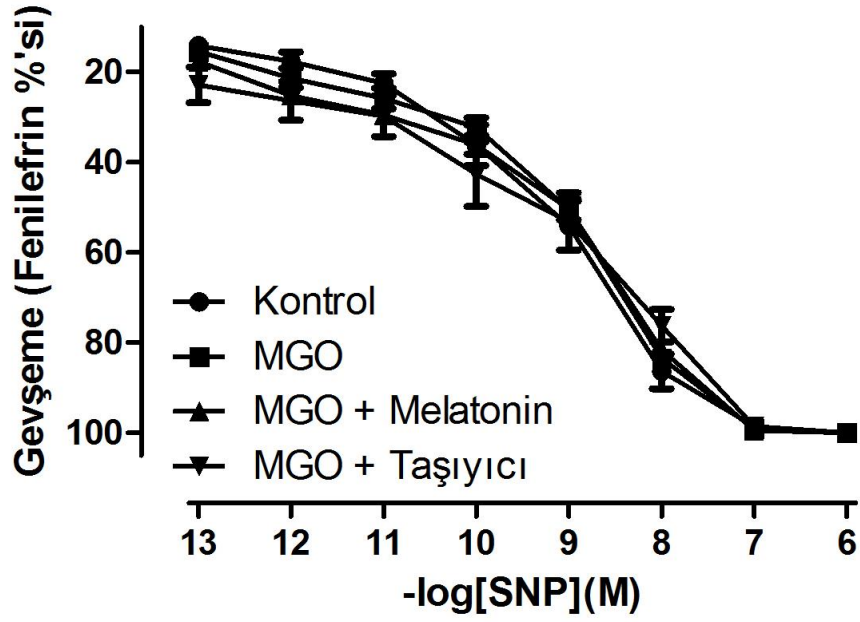
gözlenen ACh'e bağılı gevşeme yanıtlarının kontrollerdekine benzer olduğu görüldü. L-NAME inkübasyonu sonrası kontrol ve MGO grubu arasında ACh gevşeme yanıtları arasındaki fark ortadan kalktı.



Şekil 4.2.: Torasik aort halkalarında L-NAME (10^{-4} M) inkübasyonu sonrası ACh ile oluşan konsantrasyona bağılı gevşeme yanıtı.

4.3. SNP ile Oluşan Endotelden Bağımsız Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi

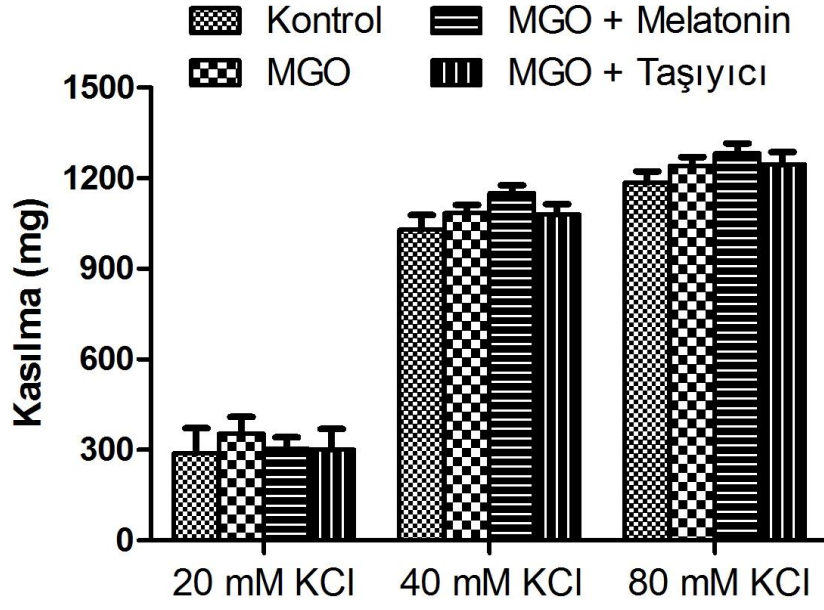
Kontrol grubu sıçanlardan elde edilen torasik aort preparatlarında SNP konsantrasyona bağılı bir gevşeme yanıtı oluşturdu (Şekil 4.3). 12 hafta süreyle MGO maruziyeti olan hayvanlardan elde edilen damarlarda ise SNP'ye bağılı gevşeme yanıtının anlamlı olarak değişmediği görüldü. MGO ile birlikte melatonin uygulanan veya MGO ve taşıyıcı alan gruplarda da SNP ile oluşan gevşeme yanıtları kontrollere göre anlamlı anlamlı bir değişiklik göstermedi.



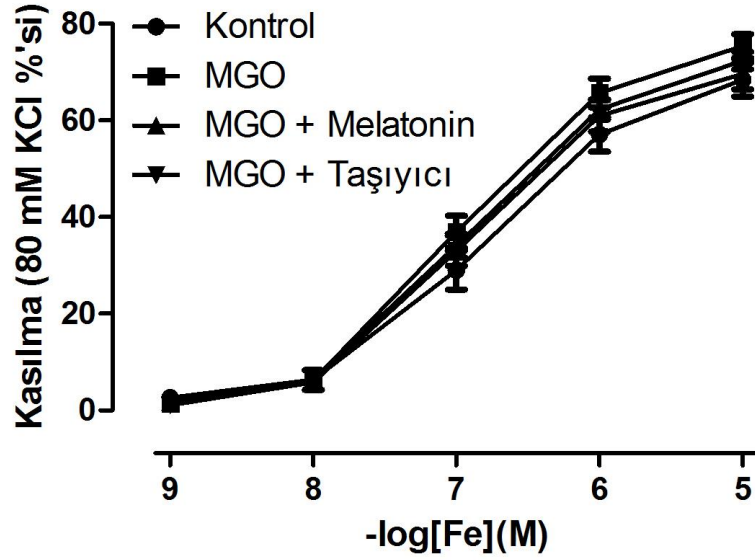
Şekil 4.3. Torasik aort halkalarında SNP ile oluşan konsantrasyona bağlı gevşeme yanıtı.

4.4. KCl ve Fenilefrin ile Oluşan Kasılma Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Kontrol grubu sıçanlardan elde edilen torasik aort preparatlarında hem KCl hem de Fe konsantrasyona bağımlı bir kasılma yanıtı oluşturdu (Şekil 4.4 ve 4.5). 12 hafta süreyle MGO maruziyeti olan hayvanlardan elde edilen damarlarda her iki kasılma yanıtının da anlamlı olarak değişmediği görüldü. MGO ile birlikte melatonin uygulanan veya MGO ve taşıyıcı alan gruplarda da kasılma yanıtları kontrollere göre anlamlı anlamlı bir değişim göstermedi.



Şekil 4.4. Torasik aort halkalarında 20-80 mM KCl ile oluşan kasılma yanıtı.



Şekil 4.5. Torasik aort halkalarında Fe ile oluşan konsantrasyona bağlı kasılma yanıtı.

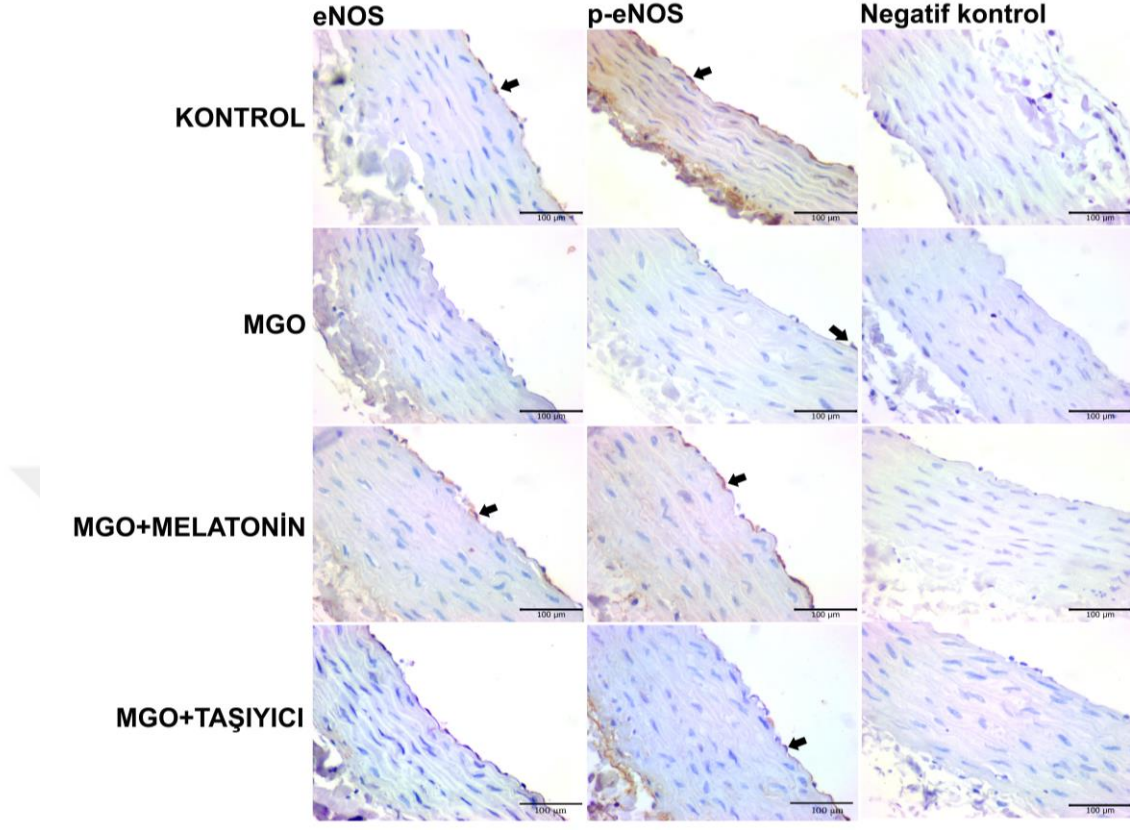
4.5. İmmunohistokimya Analizlerinin Değerlendirilmesi

Çalışmada eNOS, p-eNOS ve Cleaved kaspaz-3 ekspresyonları torasik aortun özellikle tunika intima alanında değerlendirildi ve ekspresyonlar gruplar arasında kıyaslandı.

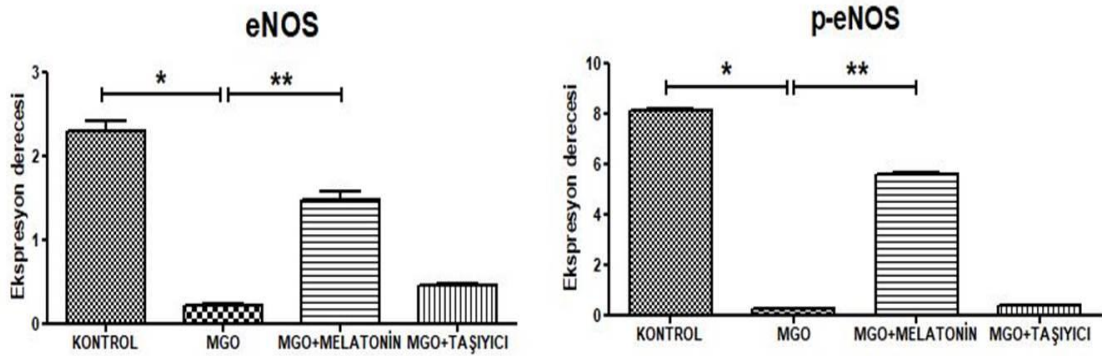
4.5.1. eNOS ve p-eNOS İmmunohistokimyası

Kontrol grubuna ait aort kesitlerinin endotellerinde yoğun eNOS ekspresyonunu görülmekteydi (Şekil 4.6). MGO ile endotel disfonksiyonu gelişen grubun aort kesitlerinde ise eNOS ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı görüldü. MGO ile birlikte melatonin uygulanan MGO + Melatonin gruplarında; endotelde eNOS ekspresyonunun kontrol hayvanlarının ekspresyonlarına yaklaşması melatoninin koruyucu etkisi belirgin şekilde göstermekteydi.

Kontrol grubuna ait aort kesitlerinde e-NOS ekspresyonlarında olduğu gibi p-eNOS (Ser 1177) ekspresyonlarında da yoğun bir immunoreaktivite görülmekteydi (Şekil 4.6). MGO grubunda endotel disfonksiyonu sonucu p-eNOS ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı görüldü. MGO + Melatonin grubunda ise p-eNOS ekspresyonunun MGO grubuna göre anlamlı şekilde arttığı görüldü. Bu bulgular Image J ile istatistiksel olarak da değerlendirildi (Şekil 4.7).



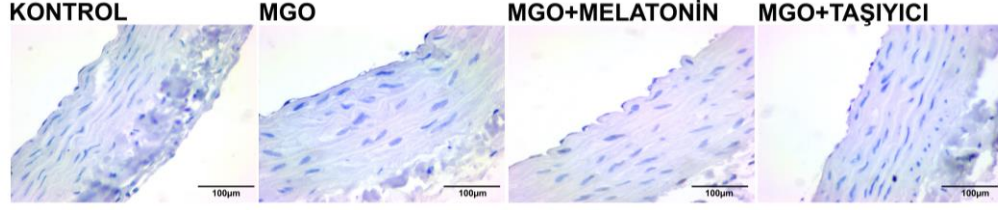
Şekil 4.6. Torasik aort halkalarında immünohistokimyasal olarak eNOS ve p-eNOS ekspresyonu



Şekil 4.7. Torasik aort halkalarında eNOS ve p-eNOS ekspresyonunun Image J analizi ile değerlendirilmesi (* $p < 0.05$ kontrole göre, ** $p < 0.05$ MGO'ya göre anlamlı).

4.5.2. Cleaved kaspaz-3 Immunohistokimyası

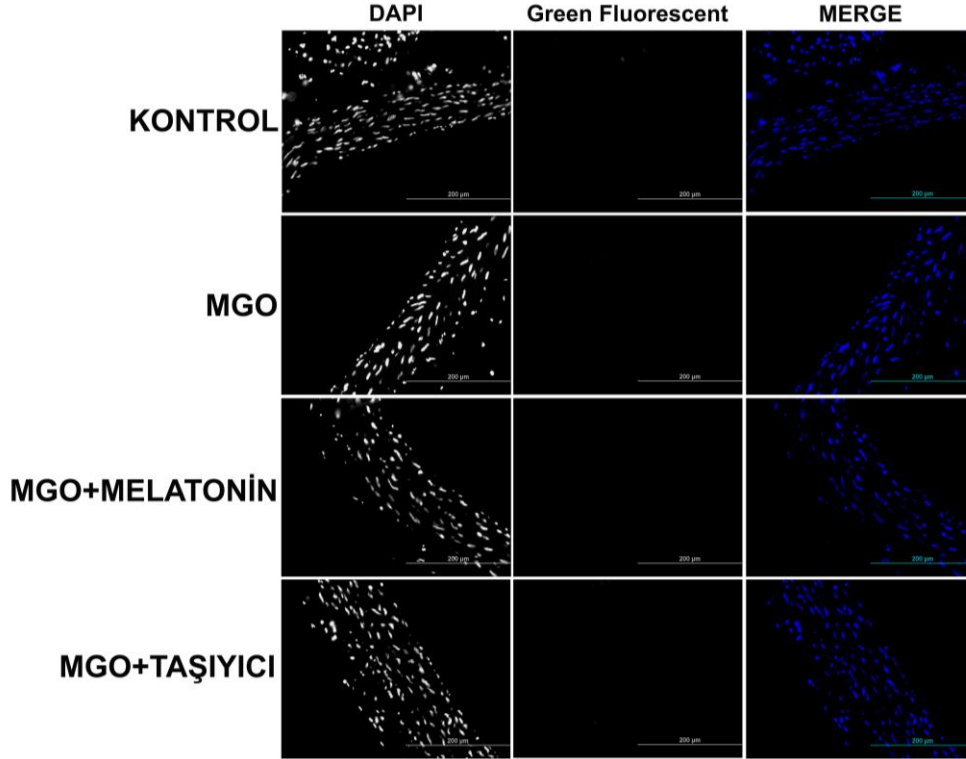
Kontrol, MGO, MGO + melatonin ve MGO + taşıyıcı gruplarının torasik aort tunika intima tabakasında Cleaved kaspaz-3 ekspresyonu görülemediği (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Torasik aort kesitlerinde Cleaved kaspaz-3 ekspresyonu. Skala bar; 100µm'dir.

4.5.3. Tünel Reaksiyonu

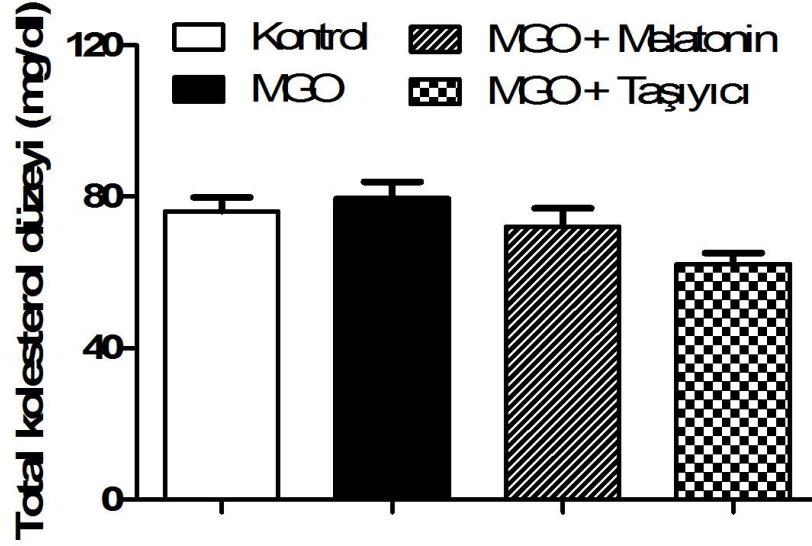
Cleaved kaspaz-3 immunoreaktivitesi damar endotelinde seçilemediğinden, apoptotik hücreleri belirlemek için DNA kırıklarının tayin etmede TUNEL yöntemine geçilmiştir. TUNEL, apoptotik hücreleri tanımlamak, ölçmek ve apoptotik DNA fragmentasyonunu tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir (Lozano ve ark., 2009). TUNEL pozitif hücrelerin kitin kullanım şartları gereğince yeşil floresan ışığa vermesi gerekmektedir. Fakat yaptığımız TUNEL deneyinde DAPI ile çiftli floresan ışığa veren apoptotik hücelere rastlanmamıştır (Şekil 4.9).



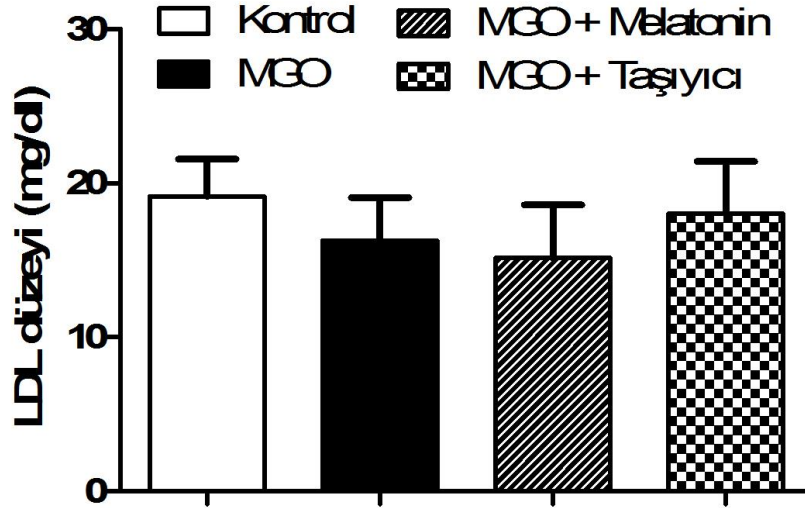
Şekil 4.9. Torasik aort kesitlerinde TUNEL değerlendirmesi. Skala bar; 200 µm'dir.

4.6. Biyokimya Parametrelerinin Değerlendirilmesi

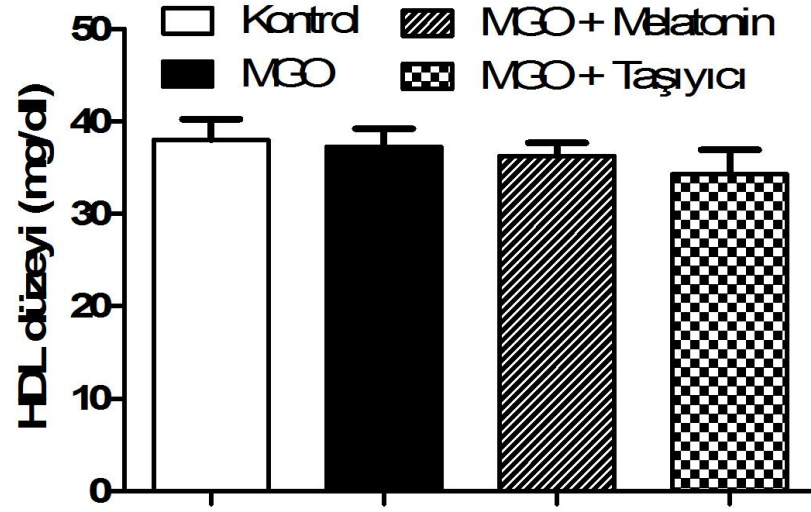
Tüm gruplardan elde edilen kan örneklerinde total kolesterol, TG, LDL-kolesterol ve HDL-kolesterol düzeyleri arasında gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.10-13).



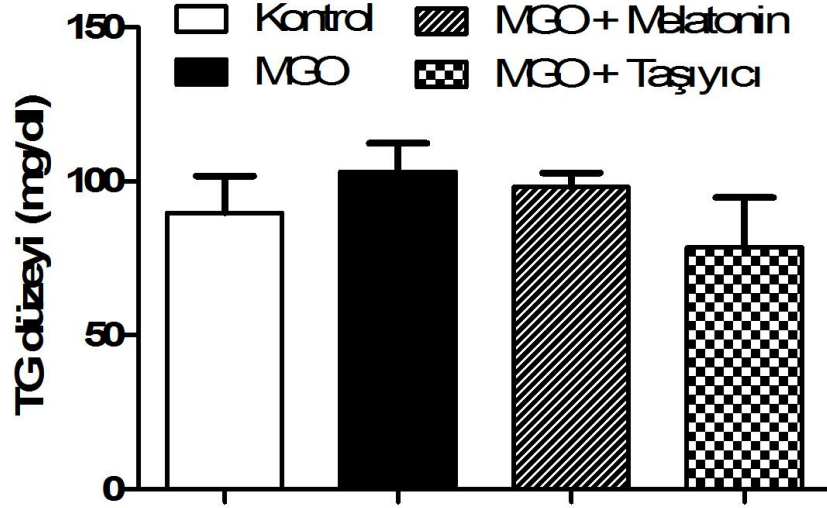
Şekil 4.10. Tüm gruplarda total kolesterol düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.11. Tüm gruplarda LDL - kolesterol düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.12. Tüm gruplarda HDL-kolesterol düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.13. Tüm gruplarda TG düzeylerinin karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı; uzun süreli melatonin uygulamasının MGO ile oluşan endotel disfonksiyonuna karşı koruyucu etkisinin olup olmadığının incelenmesi ve melatoninin olası koruyucu etkisinde eNOS ekspresyonu ve/veya aktivitesindeki değişikliklerin rolünün değerlendirilmesidir. Kontrol grubu sıçanlara 3 ay süreyle MGO uygulaması endotel disfonksiyonuna yol açmıştır. MGO ile indüklenen endotel disfonksiyonu melatonin tedavisi ile anlamlı olarak düzelmiştir. Bu çalışma, bildiğimiz kadarıyla, MGO ile indüklenen endotel disfonksiyonuna karşı melatonin'in koruyucu etkisini ve bu etkide eNOS-aracılı bir mekanizmanın rolünü gösteren literatürdeki ilk çalışmadır.

Çalışmamızda 3 ay süreyle MGO uygulanan sıçanlardan elde edilen torasik aort halkalarında ACh konsantrasyon-yanıt eğrileri oluşturulmuş ve ACh'e bağlı oluşan endotel bağımlı gevşeme yanıtlarının MGO'ya maruz kalan sıçanlarda anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Gevşeme yanıtlarında gözlenen bu azalmanın endotele bağlı olup olmadığını test etmek için aynı damarlarda endotelden bağımsız gevşeme yanıtları SNP konsantrasyon yanıt-eğrileri ile değerlendirilmiştir. MGO uygulanan sıçan aortunda SNP aracılı gevşeme yanıtlarının diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı farklı olmaması, MGO aracılı damar gevşeme yanıtlarındaki bozulmanın temel olarak endotel fonksiyonlarında azalmayla ilişkili olduğuna işaret etmektedir.

Endotel disfonksiyonu çeşitli mekanizmalarla ortaya çıkabilirse de bu mekanizmaların en önemlisi endotelden salınan NO'in azalmasıdır (Endemann ve Schiffrin, 2004). Endotelyal NO üretiminde temel rol oynayan enzim olan eNOS ekspresyonu ve/veya aktivitesindeki değişiklik MGO aracılı endotel disfonksiyonuna neden olmuş olabilir. Bu hipotezi değerlendirmek için, izole torasik aort preparatları NOS inhibitörü L-NAME ile inkübe edilmiş ve asetilkolin ile endotel bağımlı gevşeme yanıtları bu gruplar arasında yeniden değerlendirilmiştir. L-NAME gibi arginin analogları NO üretimini bloke edebildiklerinden, L-NAME varlığında NO etkileri ayrıntılı olarak çalışılabilmektedir. L-NAME varlığında kontrol ve MGO grubu arasında asetilkolin gevşeme yanıtları arasında gözlenen anlamlı farkın kaybolduğu görülmüştür. Bu sonuç, MGO aracılı endotel

disfonksiyonuna eNOS enzimi aracılı NO üretiminde azalmanın aracılık edebileceğine işaret etmektedir.

Bu olasılığı araştırmak için; torasik aort preparatlarında eNOS enzimi immünohistokimyasal analizlerle de yapısal olarak değerlendirilmiş ve MGO uygulanan sıçan aort dokusunda eNOS ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. eNOS aktivitesi enzimin serin 1177 bölgesinden fosforilasyonu ile ilişkili olduğundan (Fleming ve Busse, 2003), eNOS ekspresyonu yanısıra p-eNOS (1177) ekspresyonları da immünohistokimyasal olarak gruplar arasında değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonuçları MGO uygulanan sıçan aort kesitlerinde p-eNOS ekspresyonlarının anlamlı olarak azaldığını göstermiştir. Bu sonuçlar sıçan izole mezenterik arter (Mukohda ve ark., 2013) ve torasik aort halkalarının (Turkseven ve ark., 2014; Tasatargil ve ark., 2019) uzun süreli MGO maruziyeti sonrasında eNOS ve p-eNOS (serin 1177) ekspresyonlarının azaldığının gösterildiğı diğer çalışmalarla da uyumludur.

eNOS endotel fonksiyonu için gereklidir ve eNOS'un upregülasyonu, kan akışını arttırarak endotelin koruyucu mekanizmasına destek olur (Marletta, 1994; Albrecht ve ark., 2003). Yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlar ve diyabetik sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda da melatonin'in endotel disfonksiyonu üzerine olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (Salmanoglu ve ark., 2016). Melatoninin endotel vasküler fonksiyon üzerindeki koruyucu etkisi, yüksek yağlı diyetle beslenen insüline dirençli fare aortunda da (Sartori ve ark., 2009) gösterilmiştir. Melatonin NO seviyesini ve eNOS ekspresyonunu arttırıp endotel disfonksiyonu gelişimini önler (Rodella ve ark., 2013). Tüm bu çalışmalar, melatonin'in endotel hücrelerde eNOS'un upregülasyonu aracılığıyla koruyucu etkilerini gösterdiğine dair kanıtlar sunmaktadır. Bizim çalışmamızda ise; sıçanlarda MGO aracılı azalan eNOS ve p-eNOS ekspresyon düzeyleri melatonin tedavisi ile artmış ve kontrollere yakın bir düzeye yaklaşmıştır. MGO uygulanan sıçanların torasik aortunda gözlenen endotel bağımlı gevşeme yanıtlarındaki bozulma da bu grup hayvanlara birlikte eşzamanlı olarak melatonin uygulanması ile anlamlı olarak düzelmiştir. MGO + melatonin grubu sıçanlardan elde edilen aort dokusunda ACh aracılı gevşeme yanıtlarının kontrollere benzer olduğu görülmüştür. Endotel bağımlı gevşeme yanıtlarındaki düzelmeye paralel olarak eNOS ve p-eNOS ekspresyonunda gözlenen artış, melatonin tedavisinin MGO

aracılı endotel disfonksiyonunu anlamlı olarak düzelttiğini ve bu olumlu etkisine eNOS ve p-eNOS ekspresyonlarında artışın katkısı olabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar; MGO maruziyetinin hem eNOS ekspresyonu hem de aktivitesini etkileyerek endotel disfonksiyonuna katkıda bulunabileceğini ve melatonin uygulamasının her iki proteinin ekspresyon oranlarını arttırarak endotel fonksiyonlarını koruyabileceğini desteklemektedir. Çalışmamızın sonuçları melatonin'in eNOS ekspresyonu üzerine olan olumlu etkilerinin bildirildiği diğer çalışmalarla da (Koh, 2008; Sonmez ve ark., 2012; Hung ve ark., 2013; Nakao ve ark., 2013; Rodella ve ark., 2013) uyumludur.

Sıçanların aort dokusunda ACh aracılı gevşeme yanıtlarında MGO nedeniyle oluşan bozulmanın N-asetil-sistein (NAC) (A. Dhar ve ark., 2010) ile ve NADPH oksidazın inhibisyonu (Mukohda ve ark., 2013) aracılığıyla hafifletilebileceği gösterilmiştir. Fare korpus kavernozum dokusunda MGO aracılı NO salınımındaki bozulmanın polifenol gibi anti-oksidanlarla azaltılabileceği ve endotel kaynaklı gevşemenin arttırılabileceği bildirilmiştir (Boydens ve ark., 2016). Ayrıca, MGO'nun apoptotik süreci ilerleten ROS'u arttırdığı ileri sürülmüştür (Oba ve ark., 2012). MGO uygulanan sıçan torasik aortunda endotel-bağımlı gevşeme yanıtlarında gözlenen bu azalmanın olası bir mekanizması, MGO aracılı artan oksidatif strese bağlı apoptotik endotel hücre kaybının artması olabilir. Bununla birlikte; bu hipotezini değerlendirmek için kontrol, MGO, MGO + melatonin ve MGO + taşıyıcı gruplarının aort kesitlerinde yapılan ve apoptotik sürecin ortak belirteci olan cleaved kaspaz-3 ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak değerlendirildiği çalışmalarımız sonucunda cleaved Caspase-3 immunoreaktivitesi damar endotelinde seçilememiştir.

Gevşeme yanıtları üzerine olan etkisi yanısıra, uzun süreli MGO maruziyetinin torasik aort kasılma yanıtları üzerine etkisi olup olmadığını değerlendirmek için tüm gruplarda KCl ve Fe ile kasılma yanıtları da değerlendirilmiştir. KCl reseptör bağımsız, voltaja bağımlı bir mekanizmayla depolarizasyon sonucu hücre içi kalsiyum artışına bağlı bir kasılma yanıtına neden olurken, Fe α -adrenerjik reseptör aracılı bir mekanizma aracılığıyla hücre içi kalsiyum artışına ve damar düz kas kasılmasına aracılık etmektedir. Kronik MGO uygulanan sıçanların torasik aort halkalarında hem KCl hem de Fe ile oluşan kasılma yanıtları anlamlı olarak değişmemiştir. MGO + taşıyıcı veya MGO + melatonin

gruplarından elde edilen damar preparatlarında da KCl ve Fe ile indüklenen kasılma yanıtlarının kontrollere benzer olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ne MGO uygulamasının ne de melatonin veya taşıyıcının damar kasılma yanıtlarında anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını göstermektedir.

Deneyisel çalışmalar melatonin'in bazı metabolik etkileri olabileceğini ve glukoz metabolizması üzerinde yararlı etkileri olduğunu göstermektedir. Oral melatonin tüketimi hiperglisemi gelişmesine karşı korur (Prunet-Marcassus ve ark., 2003), insülin direncini tersine çevirir ve glukoz metabolizmasını düzeltir (Cuesta ve ark., 2013). İnsan pankreatik adacık hücreleri ile yapılan in vitro çalışmalarda, melatonine uzun süre maruz kalan adacık hücrelerinde glukoz duyarlılığının arttığı gözlenmiştir (Kemp ve ark., 2002; Ramracheya ve ark., 2008). MGO aracılı hasara karşı melatonin'in koruyucu etkisinde metabolik etkilerini dışlamak için tüm gruplardan elde edilen kan örneklerinde total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol ve TG düzeyleri değerlendirilmiş ve bu gruplar arasında tüm parametreler açısından anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar, melatoninin MGO ile oluşan endotel disfonksiyonuna karşı koruyucu etkisinde olası bir metabolik etkisinin rolü olmadığını telkin etmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamız uzun süreli MGO maruziyetine bağlı gelişen endotel disfonksiyonuna karşı melatonin tedavisinin koruyucu rolü olduğunu gösteren literatürdeki ilk çalışmadır. Melatonin aracılı oluşan bu olumlu etki eNOS ve p-eNOS ekspresyonlarında gözlenen etki ile açıklanabilir. Bu nedenle MGO maruziyetiyle ilişkili diyabet, hipertansiyon, obezite, hiperlipidemi, yaşlılık ve yüksek MGO içerikli beslenme gibi koşullarda melatonin kullanımını endotel hasarının önlenmesi açısından yararlı bir seçenek olabilir. Bununla birlikte, bu çalışma bu konuyu değerlendiren literatürdeki ilk çalışmadır ve konun değerlendirileceği yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Melatonin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu özellikleri bilinen ve pleotropik etkilere sahip önemli bir maddedir. Diyabet, hiperlipidemi, obezite, hipertansiyon, yaşlanma ve oksidatif stres gibi sık görülen klinik durumlarda MGO ve onun oluşturduğu AGE'lerin arttığı bilinmektedir (X. Wang, Desai, ve ark., 2005; Gaens ve ark., 2013). Bu gibi klinik durumların yanısıra insanlar besinlerle de yüksek miktarlarda eksojen MGO'ya maruz kalabilmektedir. Batı diyetinin AGE'lerden zengin olduğu ve besinlerin özellikle yüksek ısılarda işlem görmesi durumunda (kızartma, kavurma, ızgara, pastörize süt, peynirler, sosis, sucuk, işlenmiş etler, mısır gevreği gibi) AGE içeriğinin arttığı bilinmektedir. MGO maruziyetinin gittikçe artmakta olduğunu ve çeşitli klinik durumlarda artan MGO'nun endotel disfonksiyonu gelişiminde önemli bir ortak mekanizma olabileceğini dikkate alındığında, MGO aracılı zararlı etkileri önleme potansiyeline sahip olan bileşikler, bu klinik durumlarda ortaya çıkabilecek endotel disfonksiyonunun önlenmesinde yararlı olabilir. Melatonin eNOS üzerinde olumlu etkiler oluşturabilir ve MGO aracılı endotel hasarına karşı koruyucu rol oynayabilir.

KAYNAKLAR

Agil, A., Reiter, R. J., Jimenez-Aranda, A., Iban-Arias, R., Navarro-Alarcon, M., Marchal, J. A., . . . Fernandez-Vazquez, G. Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res.* 2013; 54 (4): 381-388.

Ahmadiasl, N., Banaei, S., Alihemmati, A., Baradaran, B., & Azimian, E. The anti-inflammatory effect of erythropoietin and melatonin on renal ischemia reperfusion injury in male rats. *Adv Pharm Bull.* 2014; 4 (1): 49-54.

Ahmed, M. U., Brinkmann Frye, E., Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R., & Baynes, J. W. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J.* 1997; 324 (Pt 2): 565-570.

Aladag, M. A., Turkoz, Y., Parlakpinar, H., Ozen, H., Egri, M., & Unal, S. C. Melatonin ameliorates cerebral vasospasm after experimental subarachnoidal haemorrhage correcting imbalance of nitric oxide levels in rats. *Neurochem Res.* 2009; 34 (11): 1935-1944.

Albrecht, E. W., Stegeman, C. A., Heeringa, P., Henning, R. H., & van Goor, H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol.* 2003; 199 (1): 8-17.

Alomar, F., Singh, J., Jang, H. S., Rozanzki, G. J., Shao, C. H., Padanilam, B. J., . . . Bidasee, K. R. Smooth muscle-generated methylglyoxal impairs endothelial cell-mediated vasodilatation of cerebral microvessels in type 1 diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 2016; 173 (23): 3307-3326.

An, R., Zhao, L., Xi, C., Li, H., Shen, G., Liu, H., . . . Sun, L. Melatonin attenuates sepsis-induced cardiac dysfunction via a pi3k/akt-dependent mechanism. *Basic Res Cardiol.* 2016; 111 (1): 8.

Ananth, C., Gopalakrishnakone, P., & Kaur, C. Protective role of melatonin in domoic acid-induced neuronal damage in the hippocampus of adult rats. *Hippocampus*. 2003; 13 (3): 375-387.

Anderson, T. J., Meredith, I. T., Charbonneau, F., Yeung, A. C., Frei, B., Selwyn, A. P., & Ganz, P. Endothelium-dependent coronary vasomotion relates to the susceptibility of ldl to oxidation in humans. *Circulation*. 1996; 93 (9): 1647-1650.

Anwar, M. M., Meki, A. R., & Rahma, H. H. Inhibitory effects of melatonin on vascular reactivity: Possible role of vasoactive mediators. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2001; 130 (3): 357-367.

Aydogdu, N., Erbas, H., Atmaca, G., Erten, O., & Kaymak, K. Melatonin reduces nitric oxide via increasing arginase in rhabdomyolysis-induced acute renal failure in rats. *Ren Fail*. 2006; 28 (5): 435-440.

Babaei-Jadidi, R., Karachalias, N., Ahmed, N., Battah, S., & Thornalley, P. J. Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes*. 2003; 52 (8): 2110-2120.

Beisswenger, B. G., Delucia, E. M., Lapoint, N., Sanford, R. J., & Beisswenger, P. J. Ketosis leads to increased methylglyoxal production on the atkins diet. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1043: 201-210.

Belforte, N. A., Moreno, M. C., de Zavalia, N., Sande, P. H., Chianelli, M. S., Keller Sarmiento, M. I., & Rosenstein, R. E. Melatonin: A novel neuroprotectant for the treatment of glaucoma. *J Pineal Res*. 2010; 48 (4): 353-364.

Bettahi, I., Pozo, D., Osuna, C., Reiter, R. J., Acuna-Castroviejo, D., & Guerrero, J. M. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res*. 1996; 20 (4): 205-210.

Bilici, D., Akpınar, E., & Kiziltunc, A. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced acute local inflammation. *Pharmacol Res*. 2002; 46 (2): 133-139.

Blanco, S., Hernandez, R., Franchelli, G., Ramos-Alvarez, M. M., & Peinado, M. A. Melatonin influences no/nos pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage. *Nitric Oxide*. 2017; 62: 32-43.

Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J., & Cohen, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994; 368 (6474): 850-853.

Bonetti, P. O., Lerman, L. O., & Lerman, A. Endothelial dysfunction: A marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23 (2): 168-175.

Bonnefond, A., Clement, N., Fawcett, K., Yengo, L., Vaillant, E., Guillaume, J. L., . . . Froguel, P. Rare *mtnr1b* variants impairing melatonin receptor 1b function contribute to type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2012; 44 (3): 297-301.

Bouatia-Naji, N., Bonnefond, A., Cavalcanti-Proenca, C., Sparso, T., Holmkvist, J., Marchand, M., . . . Froguel, P. A variant near *mtnr1b* is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet*. 2009; 41 (1): 89-94.

Bourajjaj, M., Stehouwer, C. D., van Hinsbergh, V. W., & Schalkwijk, C. G. Role of methylglyoxal adducts in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Biochem Soc Trans*. 2003; 31 (Pt 6): 1400-1402.

Boydens, C., Pauwels, B., Vanden Daele, L., & Van de Voorde, J. Protective effect of resveratrol and quercetin on in vitro-induced diabetic mouse corpus cavernosum. *Cardiovasc Diabetol*. 2016; 15: 46.

Brouwers, O., Niessen, P. M., Haenen, G., Miyata, T., Brownlee, M., Stehouwer, C. D., . . . Schalkwijk, C. G. Hyperglycaemia-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in rat mesenteric arteries is mediated by intracellular methylglyoxal levels in a pathway dependent on oxidative stress. *Diabetologia*. 2010; 53 (5): 989-1000.

Brugger, P., Marktl, W., & Herold, M. Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease. *Lancet*. 1995; 345 (8962): 1408.

Cagnacci, A., Arangino, S., Angiolucci, M., Maschio, E., & Melis, G. B. Influences of melatonin administration on the circulation of women. *Am J Physiol.* 1998; 274 (2): R335-338.

Cai, W., Uribarri, J., Zhu, L., Chen, X., Swamy, S., Zhao, Z., . . . Vlassara, H. Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111 (13): 4940-4945.

Capsoni, S., Viswanathan, M., De Oliveira, A. M., & Saavedra, J. M. Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of willis. *Endocrinology.* 1994; 135 (1): 373-378.

Chang, H. M., Ling, E. A., Lue, J. H., Wen, C. Y., & Shieh, J. Y. Melatonin attenuates neuronal nadh-d/nos expression in the hypoglossal nucleus of adult rats following peripheral nerve injury. *Brain Res.* 2000; 873 (2): 243-251.

Chen, C. F., Wang, D., Reiter, R. J., & Yeh, D. Y. Oral melatonin attenuates lung inflammation and airway hyperreactivity induced by inhalation of aerosolized pancreatic fluid in rats. *J Pineal Res.* 2011; 50 (1): 46-53.

Chen, Y. S., Chen, K. H., Liu, C. C., Lee, C. T., Yang, C. H., Chuang, K. C., & Lin, C. R. Propofol-induced vascular permeability change is related to the nitric oxide signaling pathway and occludin phosphorylation. *J Biomed Sci.* 2007; 14 (5): 629-636.

Cheng, M. C., Wu, T. H., Huang, L. T., & Tain, Y. L. Renoprotective effects of melatonin in young spontaneously hypertensive rats with l-name. *Pediatr Neonatol.* 2014; 55 (3): 189-195.

Chern, C. M., Liao, J. F., Wang, Y. H., & Shen, Y. C. Melatonin ameliorates neural function by promoting endogenous neurogenesis through the mt2 melatonin receptor in ischemic-stroke mice. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52 (9): 1634-1647.

Chua, S., Lee, F. Y., Chiang, H. J., Chen, K. H., Lu, H. I., Chen, Y. T., . . . Yip, H. K. The cardioprotective effect of melatonin and exendin-4 treatment in a rat model of cardiorenal syndrome. *J Pineal Res.* 2016; 61 (4): 438-456.

Chucharoen, P., Chetsawang, B., Putthaprasart, C., Srikiatkachorn, A., & Govitrapong, P. The presence of melatonin receptors and inhibitory effect of melatonin on hydrogen peroxide-induced endothelial nitric oxide synthase expression in bovine cerebral blood vessels. *J Pineal Res.* 2007; 43 (1): 35-41.

Cimellaro, A., Perticone, M., Fiorentino, T. V., Sciacqua, A., & Hribal, M. L. Role of endoplasmic reticulum stress in endothelial dysfunction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2016; 26 (10): 863-871.

Cominacini, L., Rigoni, A., Pasini, A. F., Garbin, U., Davoli, A., Campagnola, M., . . . Sawamura, T. The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-ldl) to ox-ldl receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J Biol Chem.* 2001; 276 (17): 13750-13755.

Cornwell, T. L., Arnold, E., Boerth, N. J., & Lincoln, T. M. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of camp-dependent protein kinase by cgmp. *Am J Physiol.* 1994; 267 (5 Pt 1): C1405-1413.

Costantino, G., Cuzzocrea, S., Mazzon, E., & Caputi, A. P. Protective effects of melatonin in zymosan-activated plasma-induced paw inflammation. *Eur J Pharmacol.* 1998; 363 (1): 57-63.

Cuesta, S., Kireev, R., Garcia, C., Rancan, L., Vara, E., & Tresguerres, J. A. Melatonin can improve insulin resistance and aging-induced pancreas alterations in senescence-accelerated prone male mice (samp8). *Age (Dordr).* 2013; 35 (3): 659-671.

Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Gilad, E., Hake, P., Salzman, A. L., & Szabo, C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: Relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res.* 1997; 23 (2): 106-116.

De Vriese, A. S., Verbeuren, T. J., Van de Voorde, J., Lameire, N. H., & Vanhoutte, P. M. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol.* 2000; 130 (5): 963-974.

Degen, J., Hellwig, M., & Henle, T. 1,2-dicarbonyl compounds in commonly consumed foods. *J Agric Food Chem.* 2012; 60 (28): 7071-7079.

Degen, J., Vogel, M., Richter, D., Hellwig, M., & Henle, T. Metabolic transit of dietary methylglyoxal. *J Agric Food Chem.* 2013; 61 (43): 10253-10260.

Deng, W. G., Tang, S. T., Tseng, H. P., & Wu, K. K. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood.* 2006; 108 (2): 518-524.

Dhar, A., Dhar, I., Desai, K. M., & Wu, L. Methylglyoxal scavengers attenuate endothelial dysfunction induced by methylglyoxal and high concentrations of glucose. *Br J Pharmacol.* 2010; 161 (8): 1843-1856.

Dhar, I., Dhar, A., Wu, L., & Desai, K. M. Methylglyoxal, a reactive glucose metabolite, increases renin angiotensin aldosterone and blood pressure in male sprague-dawley rats. *Am J Hypertens.* 2014; 27 (3): 308-316.

do Rosario, P. M., Cordeiro, C. A., Freire, A. P., & Nogueira, J. M. Analysis of methylglyoxal in water and biological matrices by capillary zone electrophoresis with diode array detection. *Electrophoresis.* 2005; 26 (9): 1760-1767.

Dominguez-Rodriguez, A., Abreu-Gonzalez, P., Jimenez-Sosa, A., Avanzas, P., Bosa-Ojeda, F., & Kaski, J. C. Usefulness of intraplatelet melatonin levels to predict angiographic no-reflow after primary percutaneous coronary intervention in patients with st-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2010; 106 (11): 1540-1544.

Dominguez-Rodriguez, A., Abreu-Gonzalez, P., & Reiter, R. J. Melatonin and cardioprotection in the acute myocardial infarction: A promising cardioprotective agent. *Int J Cardiol.* 2012; 158 (2): 309-310.

Doolen, S., Krause, D. N., Dubocovich, M. L., & Duckles, S. P. Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1998; 345 (1): 67-69.

Dubocovich, M. L. Melatonin receptors: Are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci.* 1995; 16 (2): 50-56.

Dubocovich, M. L., & Markowska, M. Functional mt1 and mt2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine.* 2005; 27 (2): 101-110.

Dwaich, K. H., Al-Amran, F. G., Al-Sheibani, B. I., & Al-Aubaidy, H. A. Melatonin effects on myocardial ischemia-reperfusion injury: Impact on the outcome in patients undergoing coronary artery bypass grafting surgery. *Int J Cardiol.* 2016; 221: 977-986.

Ekmekcioglu, C., Haslmayer, P., Philipp, C., Mehrabi, M. R., Glogar, H. D., Grimm, M., . . . Marktl, W. Expression of the mt1 melatonin receptor subtype in human coronary arteries. *J Recept Signal Transduct Res.* 2001; 21 (1): 85-91.

Ekmekcioglu, C., Thalhammer, T., Humpeler, S., Mehrabi, M. R., Glogar, H. D., Holzenbein, T., . . . Marktl, W. The melatonin receptor subtype mt2 is present in the human cardiovascular system. *J Pineal Res.* 2003; 35 (1): 40-44.

Endemann, D. H., & Schiffrin, E. L. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15 (8): 1983-1992.

Ersoz, N., Guven, A., Cayci, T., Uysal, B., Turk, E., Oztas, E., . . . Cetiner, S. Comparison of the efficacy of melatonin and 1400w on renal ischemia/reperfusion injury: A role for inhibiting inos. *Ren Fail.* 2009; 31 (8): 704-710.

Escames, G., Lopez, L. C., Ortiz, F., Ros, E., & Acuna-Castroviejo, D. Age-dependent lipopolysaccharide-induced inos expression and multiorgan failure in rats: Effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol.* 2006; 41 (11): 1165-1173.

Fang, L., Li, X., Zhong, Y., Yu, J., Yu, L., Dai, H., & Yan, M. Autophagy protects human brain microvascular endothelial cells against methylglyoxal-induced injuries, reproducible in a cerebral ischemic model in diabetic rats. *J Neurochem.* 2015; 135 (2): 431-440.

Faraci, F. M., & Heistad, D. D. Regulation of the cerebral circulation: Role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev.* 1998; 78 (1): 53-97.

Feng, Z., & Zhang, J. T. Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma c6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37 (11): 1790-1801.

Fishman, A. P. Endothelium: A distributed organ of diverse capabilities. *Ann N Y Acad Sci.* 1982; 401: 1-8.

Fleming, I., & Busse, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284 (1): R1-12.

Fujioka, K., & Shibamoto, T. Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke. *Environ Toxicol.* 2006; 21 (1): 47-54.

Furchgott, R. F. The 1996 albert lasker medical research awards. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *JAMA.* 1996; 276 (14): 1186-1188.

Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288 (5789): 373-376.

Gaens, K. H., Stehouwer, C. D., & Schalkwijk, C. G. Advanced glycation endproducts and its receptor for advanced glycation endproducts in obesity. *Curr Opin Lipidol.* 2013; 24 (1): 4-11.

Gauthier, T. W., Scalia, R., Murohara, T., Guo, J. P., & Lefer, A. M. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15 (10): 1652-1659.

Gilad, E., Wong, H. R., Zingarelli, B., Virag, L., O'Connor, M., Salzman, A. L., & Szabo, C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in

murine macrophages: Role of inhibition of nfkappab activation. *FASEB J.* 1998; 12 (9): 685-693.

Girotti, L., Lago, M., Ianovsky, O., Carbajales, J., Elizari, M. V., Brusco, L. I., & Cardinali, D. P. Low urinary 6-sulphatoxymelatonin levels in patients with coronary artery disease. *J Pineal Res.* 2000; 29 (3): 138-142.

Girotti, L., Lago, M., Ianovsky, O., Elizari, M. V., Dini, A., Perez Lloret, S., . . . Cardinali, D. P. Low urinary 6-sulfatoxymelatonin levels in patients with severe congestive heart failure. *Endocrine.* 2003; 22 (3): 245-248.

Girouard, H., Chulak, C., Lejossec, M., Lamontagne, D., & de Champlain, J. Vasorelaxant effects of the chronic treatment with melatonin on mesenteric artery and aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2001; 19 (8): 1369-1377.

Hanikoglu, A., Kucuksayan, E., Akduman, R. C., & Ozben, T. A review on melatonin's effects in cancer: Potential mechanisms. *Anticancer Agents Med Chem.* 2018; 18 (7): 985-992.

Hardeland, R. Antioxidative protection by melatonin: Multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine.* 2005; 27 (2): 119-130.

Hardeland, R. Melatonin, hormone of darkness and more: Occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65 (13): 2001-2018.

Hardeland, R. Melatonin: Signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors.* 2009; 35 (2): 183-192.

Hardeland, R., Cardinali, D. P., Srinivasan, V., Spence, D. W., Brown, G. M., & Pandi-Perumal, S. R. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol.* 2011; 93 (3): 350-384.

Hikichi, T., Tateda, N., & Miura, T. Alteration of melatonin secretion in patients with type 2 diabetes and proliferative diabetic retinopathy. *Clin Ophthalmol.* 2011; 5: 655-660.

Hu, Z. P., Fang, X. L., Fang, N., Wang, X. B., Qian, H. Y., Cao, Z., . . . Wang, Y. Melatonin ameliorates vascular endothelial dysfunction, inflammation, and atherosclerosis by suppressing the tlr4/nf-kappab system in high-fat-fed rabbits. *J Pineal Res.* 2013; 55 (4): 388-398.

Hung, M. W., Kravtsov, G. M., Lau, C. F., Poon, A. M., Tipoe, G. L., & Fung, M. L. Melatonin ameliorates endothelial dysfunction, vascular inflammation, and systemic hypertension in rats with chronic intermittent hypoxia. *J Pineal Res.* 2013; 55 (3): 247-256.

Hung, M. W., Yeung, H. M., Lau, C. F., Poon, A. M. S., Tipoe, G. L., & Fung, M. L. Melatonin attenuates pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (6).

Iglarz, M., & Clozel, M. Mechanisms of et-1-induced endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007; 50 (6): 621-628.

Izykowska, I., Cegielski, M., Gebarowska, E., Podhorska-Okolow, M., Piotrowska, A., Zabel, M., & Dziegiel, P. Effect of melatonin on human keratinocytes and fibroblasts subjected to uva and uvb radiation in vitro. *In Vivo.* 2009; 23 (5): 739-745.

Javanmard, S. H., Heshmat-Ghahdarijani, K., Mirmohammad-Sadeghi, M., Sonbolestan, S. A., & Ziayi, A. The effect of melatonin on endothelial dysfunction in patient undergoing coronary artery bypass grafting surgery. *Adv Biomed Res.* 2016; 5: 174.

Javeshghani, D., Barhoumi, T., Idris-Khodja, N., Paradis, P., & Schiffrin, E. L. Reduced macrophage-dependent inflammation improves endothelin-1-induced vascular injury. *Hypertension.* 2013; 62 (1): 112-117.

Jiang, T., Chang, Q., Cai, J., Fan, J., Zhang, X., & Xu, G. Protective effects of melatonin on retinal inflammation and oxidative stress in experimental diabetic retinopathy. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 3528274.

Jumnongprakhon, P., Govitrapong, P., Tocharus, C., & Tocharus, J. Melatonin promotes blood-brain barrier integrity in methamphetamine-induced inflammation in primary rat brain microvascular endothelial cells. *Brain Res.* 2016; 1646: 182-192.

Jung, K. H., Hong, S. W., Zheng, H. M., Lee, D. H., & Hong, S. S. Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model. *J Pineal Res.* 2009; 47 (2): 173-183.

Kalapos, M. P. Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett.* 1999; 110 (3): 145-175.

Kang, Y. S., Kang, Y. G., Park, H. J., Wee, H. J., Jang, H. O., Bae, M. K., & Bae, S. K. Melatonin inhibits visfatin-induced inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophages. *J Pineal Res.* 2013; 55 (3): 294-303.

Karadayian, A. G., Bustamante, J., Czerniczyniec, A., Cutrera, R. A., & Lores-Arnaiz, S. Effect of melatonin on motor performance and brain cortex mitochondrial function during ethanol hangover. *Neuroscience.* 2014; 269: 281-289.

Kemp, D. M., Ubeda, M., & Habener, J. F. Identification and functional characterization of melatonin mel 1a receptors in pancreatic beta cells: Potential role in incretin-mediated cell function by sensitization of camp signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 191 (2): 157-166.

Kilic, U., Kilic, E., Reiter, R. J., Bassetti, C. L., & Hermann, D. M. Signal transduction pathways involved in melatonin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia in mice. *J Pineal Res.* 2005; 38 (1): 67-71.

Klimentova, J., Cebova, M., Barta, A., Matuskova, Z., Vrankova, S., Rehakova, R., . . . Pechanova, O. Effect of melatonin on blood pressure and nitric oxide generation in rats with metabolic syndrome. *Physiol Res.* 2016; 65 (Suppl 3): S373-S380.

Koh, P. O. Melatonin regulates nitric oxide synthase expression in ischemic brain injury. *J Vet Med Sci.* 2008; 70 (7): 747-750.

Kozirog, M., Poliwczak, A. R., Duchnowicz, P., Koter-Michalak, M., Sikora, J., & Broncel, M. Melatonin treatment improves blood pressure, lipid profile, and parameters of oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *J Pineal Res.* 2011; 50 (3): 261-266.

Kranzhofer, R., Schmidt, J., Pfeiffer, C. A., Hagl, S., Libby, P., & Kubler, W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19 (7): 1623-1629.

Krauchi, K., Cajochen, C., & Wirz-Justice, A. A relationship between heat loss and sleepiness: Effects of postural change and melatonin administration. *J Appl Physiol* (1985). 1997; 83 (1): 134-139.

Kurcer, Z., Parlakpınar, H., Vardi, N., Tasdemir, S., Iraz, M., Fadillioglu, E., . . . Gul, M. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal ischemia/reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007; 115 (6): 365-371.

Leon, J., Escames, G., Rodriguez, M. I., Lopez, L. C., Tapias, V., Entrena, A., . . . Acuna-Castroviejo, D. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by n1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *J Neurochem.* 2006; 98 (6): 2023-2033.

Lerman, A., Webster, M. W., Chesebro, J. H., Edwards, W. D., Wei, C. M., Fuster, V., & Burnett, J. C., Jr. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in hypercholesterolemic pigs. *Circulation.* 1993; 88 (6): 2923-2928.

Li, W., Chen, Z., Yan, M., He, P., Chen, Z., & Dai, H. The protective role of isorhamnetin on human brain microvascular endothelial cells from cytotoxicity induced by methylglyoxal and oxygen-glucose deprivation. *J Neurochem.* 2016; 136 (3): 651-659.

Li, W., Maloney, R. E., & Aw, T. Y. High glucose, glucose fluctuation and carbonyl stress enhance brain microvascular endothelial barrier dysfunction: Implications for diabetic cerebral microvasculature. *Redox Biol.* 2015; 5: 80-90.

Li, Z., Nickkholgh, A., Yi, X., Bruns, H., Gross, M. L., Hoffmann, K., . . . Schemmer, P. Melatonin protects kidney grafts from ischemia/reperfusion injury through inhibition of nf-kb and apoptosis after experimental kidney transplantation. *J Pineal Res.* 2009; 46 (4): 365-372.

Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002; 105 (9): 1135-1143.

Liu, H., Yu, S., Zhang, H., & Xu, J. Angiogenesis impairment in diabetes: Role of methylglyoxal-induced receptor for advanced glycation endproducts, autophagy and vascular endothelial growth factor receptor 2. *PLoS One.* 2012; 7 (10): e46720.

Lo Faro, M. L., Fox, B., Whatmore, J. L., Winyard, P. G., & Whiteman, M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. *Nitric Oxide.* 2014; 41: 38-47.

Lozano, G. M., Bejarano, I., Espino, J., Gonzalez, D., Ortiz, A., Garcia, J. F., . . . Pariente, J. A. Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone. *J Reprod Dev.* 2009; 55 (6): 615-621.

Lyles, G. A., & Chalmers, J. The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery. *Biochem Pharmacol.* 1992; 43 (7): 1409-1414.

MacKenzie, R. S., Melan, M. A., Passey, D. K., & Witt-Enderby, P. A. Dual coupling of mt(1) and mt(2) melatonin receptors to cyclic amp and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63 (4): 587-595.

Maessen, D. E., Stehouwer, C. D., & Schalkwijk, C. G. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci (Lond).* 2015; 128 (12): 839-861.

Mahmood, D., Muhammad, B. Y., Alghani, M., J., A., el-Lebban, N., & Haider, M. Advancing role of melatonin in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences.* 2016; 3 (3): 15.

Mailliet, F., Ferry, G., Vella, F., Berger, S., Coge, F., Chomarat, P., . . . Boutin, J. A. Characterization of the melatonergic mt3 binding site on the nrh:Quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol.* 2005; 71 (1-2): 74-88.

Marletta, M. A. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. *Cell.* 1994; 78 (6): 927-930.

Martins, S. I., & Van Boekel, M. A. Kinetic modelling of amadori n-(1-deoxy-d-fructos-1-yl)-glycine degradation pathways. Part ii--kinetic analysis. *Carbohydr Res.* 2003; 338 (16): 1665-1678.

Masana, M. I., Doolen, S., Ersahin, C., Al-Ghoul, W. M., Duckles, S. P., Dubocovich, M. L., & Krause, D. N. Mt(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 302 (3): 1295-1302.

Masri, F. A., Comhair, S. A., Dostanic-Larson, I., Kaneko, F. T., Dweik, R. A., Arroliga, A. C., & Erzurum, S. C. Deficiency of lung antioxidants in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Clin Transl Sci.* 2008; 1 (2): 99-106.

Mayo, J. C., Sainz, R. M., Tan, D. X., Hardeland, R., Leon, J., Rodriguez, C., & Reiter, R. J. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, n1-acetyl-n2-formyl-5-methoxykynuramine (afmk) and n1-acetyl-5-methoxykynuramine (amk), in macrophages. *J Neuroimmunol.* 2005; 165 (1-2): 139-149.

Moore, R. Y. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res.* 1996; 73 (1-2): 125-130.

Mukohda, M., Morita, T., Okada, M., Hara, Y., & Yamawaki, H. Long-term methylglyoxal treatment causes endothelial dysfunction of rat isolated mesenteric artery. *J Vet Med Sci.* 2013; 75 (2): 151-157.

Mukohda, M., Okada, M., Hara, Y., & Yamawaki, H. Methylglyoxal accumulation in arterial walls causes vascular contractile dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Sci.* 2012; 120 (1): 26-35.

Mutoh, T., Shibata, S., Korf, H. W., & Okamura, H. Melatonin modulates the light-induced sympathoexcitation and vagal suppression with participation of the suprachiasmatic nucleus in mice. *J Physiol.* 2003; 547 (Pt 1): 317-332.

Nair, S. M., Rahman, R. M., Clarkson, A. N., Sutherland, B. A., Taurin, S., Sammut, I. A., & Appleton, I. Melatonin treatment following stroke induction modulates l-arginine metabolism. *J Pineal Res.* 2011; 51 (3): 313-323.

Nakao, T., Morita, H., Maemura, K., Amiya, E., Inajima, T., Saito, Y., . . . Komuro, I. Melatonin ameliorates angiotensin ii-induced vascular endothelial damage via its antioxidative properties. *J Pineal Res.* 2013; 55 (3): 287-293.

Nathan, C., & Xie, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem.* 1994; 269 (19): 13725-13728.

Nemet, I., Varga-Defterdarovic, L., & Turk, Z. Methylglyoxal in food and living organisms. *Mol Nutr Food Res.* 2006; 50 (12): 1105-1117.

Oba, T., Tatsunami, R., Sato, K., Takahashi, K., Hao, Z., & Tampo, Y. Methylglyoxal has deleterious effects on thioredoxin in human aortic endothelial cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2012; 34 (2): 117-126.

Onder, R. B., B. Endotel: İyi İsler Matbaası; 2005, p:

Ortiz, F., Garcia, J. A., Acuna-Castroviejo, D., Doerrier, C., Lopez, A., Venegas, C., . . . Escames, G. The beneficial effects of melatonin against heart mitochondrial impairment during sepsis: Inhibition of inos and preservation of nnos. *J Pineal Res.* 2014; 56 (1): 71-81.

Oya, T., Hattori, N., Mizuno, Y., Miyata, S., Maeda, S., Osawa, T., & Uchida, K. Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *J Biol Chem.* 1999; 274 (26): 18492-18502.

Palmer, R. M., Ashton, D. S., & Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from l-arginine. *Nature.* 1988; 333 (6174): 664-666.

Pandi-Perumal, S. R., BaHamam, A. S., Ojike, N. I., Akinseye, O. A., Kendzerska, T., Buttoo, K., . . . Cardinali, D. P. Melatonin and human cardiovascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2017; 22 (2): 122-132.

Pandi-Perumal, S. R., Srinivasan, V., Maestroni, G. J., Cardinali, D. P., Poeggeler, B., & Hardeland, R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 2006; 273 (13): 2813-2838.

Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D. W., Maestroni, G. J., Zisapel, N., & Cardinali, D. P. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol.* 2008; 85 (3): 335-353.

Pang, C. S., Xi, S. C., Brown, G. M., Pang, S. F., & Shiu, S. Y. 2[125i]iodomelatonin binding and interaction with beta-adrenergic signaling in chick heart/coronary artery physiology. *J Pineal Res.* 2002; 32 (4): 243-252.

Park, E., & Chun, H. S. Melatonin attenuates manganese and lipopolysaccharide-induced inflammatory activation of bv2 microglia. *Neurochem Res.* 2017; 42 (2): 656-666.

Park, S. W., Choi, S. M., & Lee, S. M. Effect of melatonin on altered expression of vasoregulatory genes during hepatic ischemia/reperfusion. *Arch Pharm Res.* 2007; 30 (12): 1619-1624.

Paulis, L., Pechanova, O., Zicha, J., Barta, A., Gardlik, R., Celec, P., . . . Simko, F. Melatonin interactions with blood pressure and vascular function during l-name-induced hypertension. *J Pineal Res.* 2010; 48 (2): 102-108.

Paulis, L., Pechanova, O., Zicha, J., Liskova, S., Celec, P., Mullerova, M., . . . Simko, F. Melatonin improves the restoration of endothelium-derived constricting factor signalling and inner diameter in the rat femoral artery after cessation of l-name treatment. *J Hypertens.* 2010; 28 Suppl 1: S19-24.

Pechanova, O., Paulis, L., & Simko, F. Peripheral and central effects of melatonin on blood pressure regulation. *Int J Mol Sci.* 2014; 15 (10): 17920-17937.

Peschke, E., Frese, T., Chankiewitz, E., Peschke, D., Preiss, U., Schneyer, U., . . . Muhlbauer, E. Diabetic goto kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res.* 2006; 40 (2): 135-143.

Petit, L., Lacroix, I., de Coppet, P., Strosberg, A. D., & Jockers, R. Differential signaling of human mella and mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol.* 1999; 58 (4): 633-639.

Phillips, S. A., & Thornalley, P. J. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur J Biochem.* 1993; 212 (1): 101-105.

Picinato, M. C., Hirata, A. E., Cipolla-Neto, J., Curi, R., Carvalho, C. R., Anhe, G. F., & Carpinelli, A. R. Activation of insulin and igf-1 signaling pathways by melatonin through mt1 receptor in isolated rat pancreatic islets. *J Pineal Res.* 2008; 44 (1): 88-94.

Potenza, M. A., Gagliardi, S., Nacci, C., Carratu, M. R., & Montagnani, M. Endothelial dysfunction in diabetes: From mechanisms to therapeutic targets. *Curr Med Chem.* 2009; 16 (1): 94-112.

Pozo, D., Reiter, R. J., Calvo, J. R., & Guerrero, J. M. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic gmp production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem.* 1997; 65 (3): 430-442.

Prunet-Marcassus, B., Desbazeille, M., Bros, A., Louche, K., Delagrangue, P., Renard, P., . . . Penicaud, L. Melatonin reduces body weight gain in sprague dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology.* 2003; 144 (12): 5347-5352.

Puchalski, S. S., Green, J. N., & Rasmussen, D. D. Melatonin effect on rat body weight regulation in response to high-fat diet at middle age. *Endocrine.* 2003; 21 (2): 163-167.

Pugazhenthii, K., Kapoor, M., Clarkson, A. N., Hall, I., & Appleton, I. Melatonin accelerates the process of wound repair in full-thickness incisional wounds. *J Pineal Res.* 2008; 44 (4): 387-396.

Rabbani, N., & Thornalley, P. J. Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis lc-ms/ms with corroborative prediction in physiological samples. *Nat Protoc.* 2014; 9 (8): 1969-1979.

Rabbani, N., & Thornalley, P. J. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 458 (2): 221-226.

Rabbani, N., Xue, M., & Thornalley, P. J. Methylglyoxal-induced dicarbonyl stress in aging and disease: First steps towards glyoxalase 1-based treatments. *Clin Sci (Lond).* 2016; 130 (19): 1677-1696.

Ramracheya, R. D., Muller, D. S., Squires, P. E., Brereton, H., Sugden, D., Huang, G. C., . . . Persaud, S. J. Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J Pineal Res.* 2008; 44 (3): 273-279.

Reiter, R. J. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.* 1991; 12 (2): 151-180.

Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M., & Qin, L. Melatonin as an antioxidant: Under promises but over delivers. *J Pineal Res.* 2016; 61 (3): 253-278.

Reiter, R. J., Oh, C. S., & Fujimori, O. Melatonin its intracellular and genomic actions. *Trends Endocrinol Metab.* 1996; 7 (1): 22-27.

Reiter, R. J., Tan, D. X., Gitto, E., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Leon, J., . . . Kilic, U. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol J Pharmacol.* 2004; 56 (2): 159-170.

Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Lopez-Burillo, S., Sainz, R. M., & Mayo, J. C. Melatonin: Detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 527: 539-548.

- Reiter, R. J., Tan, D. X., Paredes, S. D., & Fuentes-Broto, L. Beneficial effects of melatonin in cardiovascular disease. *Ann Med.* 2010; 42 (4): 276-285.
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., Rivkees, S. A., & Stopa, E. G. Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science.* 1988; 242 (4875): 78-81.
- Risbano, M. G., & Gladwin, M. T. Therapeutics targeting of dysregulated redox equilibrium and endothelial dysfunction. *Handb Exp Pharmacol.* 2013; 218: 315-349.
- Robeva, R., Kirilov, G., Tomova, A., & Kumanov, P. Low testosterone levels and unimpaired melatonin secretion in young males with metabolic syndrome. *Andrologia.* 2006; 38 (6): 216-220.
- Robeva, R., Kirilov, G., Tomova, A., & Kumanov, P. Melatonin-insulin interactions in patients with metabolic syndrome. *J Pineal Res.* 2008; 44 (1): 52-56.
- Rodella, L. F., Favero, G., Rossini, C., Foglio, E., Bonomini, F., Reiter, R. J., & Rezzani, R. Aging and vascular dysfunction: Beneficial melatonin effects. *Age (Dordr).* 2013; 35 (1): 103-115.
- Rodrigues, L., Matafome, P., Crisostomo, J., Santos-Silva, D., Sena, C., Pereira, P., & Seica, R. Advanced glycation end products and diabetic nephropathy: A comparative study using diabetic and normal rats with methylglyoxal-induced glycation. *J Physiol Biochem.* 2014; 70 (1): 173-184.
- Rodriguez, M. I., Escames, G., Lopez, L. C., Lopez, A., Garcia, J. A., Ortiz, F., & Acuna-Castroviejo, D. Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res.* 2007; 42 (3): 272-279.
- Saenz, D. A., Turjanski, A. G., Sacca, G. B., Marti, M., Doctorovich, F., Sarmiento, M. I., . . . Rosenstein, R. E. Physiological concentrations of melatonin inhibit the nitridergic pathway in the syrian hamster retina. *J Pineal Res.* 2002; 33 (1): 31-36.

Sakotnik, A., Liebmann, P. M., Stoschitzky, K., Lercher, P., Schauenstein, K., Klein, W., & Eber, B. Decreased melatonin synthesis in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J.* 1999; 20 (18): 1314-1317.

Salmanoglu, D. S., Gurpinar, T., Vural, K., Ekerbicer, N., Dariverenli, E., & Var, A. Melatonin and l-carnitin improves endothelial dysfunction and oxidative stress in type 2 diabetic rats. *Redox Biol.* 2016; 8: 199-204.

Sanchez-Barcelo, E. J., Mediavilla, M. D., & Reiter, R. J. Clinical uses of melatonin in pediatrics. *Int J Pediatr.* 2011; 2011: 892624.

Sartori, C., Dessen, P., Mathieu, C., Monney, A., Bloch, J., Nicod, P., . . . Duplain, H. Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice. *Endocrinology.* 2009; 150 (12): 5311-5317.

Satake, N., Oe, H., & Shibata, S. Vasorelaxing action of melatonin in rat isolated aorta; possible endothelium dependent relaxation. *Gen Pharmacol.* 1991; 22 (6): 1127-1133.

Schalkwijk, C. G. Vascular age-ing by methylglyoxal: The past, the present and the future. *Diabetologia.* 2015; 58 (8): 1715-1719.

Schalkwijk, C. G., van Bezu, J., van der Schors, R. C., Uchida, K., Stehouwer, C. D., & van Hinsbergh, V. W. Heat-shock protein 27 is a major methylglyoxal-modified protein in endothelial cells. *FEBS Lett.* 2006; 580 (6): 1565-1570.

Seagroves, T. N., Ryan, H. E., Lu, H., Wouters, B. G., Knapp, M., Thibault, P., . . . Johnson, R. S. Transcription factor hif-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2001; 21 (10): 3436-3444.

Sena, C. M., Matafome, P., Crisostomo, J., Rodrigues, L., Fernandes, R., Pereira, P., & Seica, R. M. Methylglyoxal promotes oxidative stress and endothelial dysfunction. *Pharmacol Res.* 2012; 65 (5): 497-506.

Shamsaldeen, Y. A., Mackenzie, L. S., Lione, L. A., & Benham, C. D. Methylglyoxal, a metabolite increased in diabetes is associated with insulin resistance, vascular dysfunction and neuropathies. *Curr Drug Metab.* 2016; 17 (4): 359-367.

Sharma, S., Singh, H., Ahmad, N., Mishra, P., & Tiwari, A. The role of melatonin in diabetes: Therapeutic implications. *Arch Endocrinol Metab.* 2015; 59 (5): 391-399.

Shi, D., Xiao, X., Wang, J., Liu, L., Chen, W., Fu, L., . . . Deng, W. Melatonin suppresses proinflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated crl1999 cells via targeting mapk, nf-kappab, c/ebpbeta, and p300 signaling. *J Pineal Res.* 2012; 53 (2): 154-165.

Sigmon, D. H., Florentino-Pineda, I., Van Dyke, R. A., & Beierwaltes, W. H. Halothane impairs the hemodynamic influence of endothelium-derived nitric oxide. *Anesthesiology.* 1995; 82 (1): 135-143.

Silva, C. L., Tamura, E. K., Macedo, S. M., Cecon, E., Bueno-Alves, L., Farsky, S. H., . . . Markus, R. P. Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol.* 2007; 151 (2): 195-205.

Simko, F., & Paulis, L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment. *J Pineal Res.* 2007; 42 (4): 319-322.

Slominski, R. M., Reiter, R. J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R. S., & Slominski, A. T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 351 (2): 152-166.

Sonmez, M. F., Narin, F., Akkus, D., & Turkmen, A. B. Melatonin and vitamin c ameliorate alcohol-induced oxidative stress and enos expression in rat kidney. *Ren Fail.* 2012; 34 (4): 480-486.

Stankov, B., Capsoni, S., Lucini, V., Fauteck, J., Gatti, S., Gridelli, B., . . . Fraschini, F. Autoradiographic localization of putative melatonin receptors in the brains of two old world primates: *Cercopithecus aethiops* and *papio ursinus*. *Neuroscience.* 1993; 52 (2): 459-468.

Su, H., Li, J., Chen, T., Li, N., Xiao, J., Wang, S., . . . Bu, P. Melatonin attenuates angiotensin ii-induced cardiomyocyte hypertrophy through the cypa/cd147 signaling pathway. *Mol Cell Biochem.* 2016; 422 (1-2): 85-95.

Szmitko, P. E., Wang, C. H., Weisel, R. D., de Almeida, J. R., Anderson, T. J., & Verma, S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part i. *Circulation.* 2003; 108 (16): 1917-1923.

Tain, Y. L., Huang, L. T., Lin, I. C., Lau, Y. T., & Lin, C. Y. Melatonin prevents hypertension and increased asymmetric dimethylarginine in young spontaneous hypertensive rats. *J Pineal Res.* 2010; 49 (4): 390-398.

Tamura, E. K., Cecon, E., Monteiro, A. W., Silva, C. L., & Markus, R. P. Melatonin inhibits lps-induced no production in rat endothelial cells. *J Pineal Res.* 2009; 46 (3): 268-274.

Tamura, E. K., Silva, C. L., & Markus, R. P. Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production in vitro. *J Pineal Res.* 2006; 41 (3): 267-274.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Hardeland, R., Lopez-Burillo, S., Mayo, J. C., Sainz, R. M., & Reiter, R. J. Melatonin: A hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res.* 2003; 34 (1): 75-78.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Qin, L., & Reiter, R. J. Melatonin: A mitochondrial targeting molecule involving mitochondrial protection and dynamics. *Int J Mol Sci.* 2016; 17 (12).

Tan, D. X., Reiter, R. J., Manchester, L. C., Yan, M. T., El-Sawi, M., Sainz, R. M., . . . Hardeland, R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: Melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem.* 2002; 2 (2): 181-197.

Tasatargil, A., Tanriover, G., Barutcgil, A., & Turkmen, E. Protective effect of resveratrol on methylglyoxal-induced endothelial dysfunction in aged rats. *Aging Clin Exp Res.* 2019; 31 (3): 331-338.

Taysi, S., Koc, M., Buyukokuroglu, M. E., Altinkaynak, K., & Sahin, Y. N. Melatonin reduces lipid peroxidation and nitric oxide during irradiation-induced oxidative injury in the rat liver. *J Pineal Res.* 2003; 34 (3): 173-177.

Thornalley, P. J. Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochem J.* 1988; 254 (3): 751-755.

Thornalley, P. J., Langborg, A., & Minhas, H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J.* 1999; 344 Pt 1: 109-116.

Tocharus, J., Chongthammakun, S., & Govitrapong, P. Melatonin inhibits amphetamine-induced nitric oxide synthase mrna overexpression in microglial cell lines. *Neurosci Lett.* 2008; 439 (2): 134-137.

Toth, A. E., Walter, F. R., Bocsik, A., Santha, P., Veszeka, S., Nagy, L., . . . Deli, M. A. Edaravone protects against methylglyoxal-induced barrier damage in human brain endothelial cells. *PLoS One.* 2014; 9 (7): e100152.

Tummala, P. E., Chen, X. L., Sundell, C. L., Laursen, J. B., Hammes, C. P., Alexander, R. W., . . . Medford, R. M. Angiotensin ii induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation.* 1999; 100 (11): 1223-1229.

Turkseven, S., Ertuna, E., Yetik-Anacak, G., & Yasa, M. Methylglyoxal causes endothelial dysfunction: The role of endothelial nitric oxide synthase and amp-activated protein kinase alpha. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2014; 25 (1): 109-115.

Valero, N., Espina, L. M., & Mosquera, J. Melatonin decreases nitric oxide production, inducible nitric oxide synthase expression and lipid peroxidation induced by venezuelan encephalitis equine virus in neuroblastoma cell cultures. *Neurochem Res.* 2006; 31 (7): 925-932.

Vanecek, J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 1998; 78 (3): 687-721.

Vanecek, J., & Jansky, L. Short days induce changes in specific melatonin binding in hamster median eminence and anterior pituitary. *Brain Res.* 1989; 477 (1-2): 387-390.

Vanecek, J., Pavlik, A., & Illnerova, H. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res.* 1987; 435 (1-2): 359-362.

Vasdev, S., Ford, C. A., Longerich, L., Parai, S., Gadag, V., & Wadhawan, S. Aldehyde induced hypertension in rats: Prevention by n-acetyl cysteine. *Artery.* 1998; 23 (1): 10-36.

Venema, R. C., Sayegh, H. S., Arnal, J. F., & Harrison, D. G. Role of the enzyme calmodulin-binding domain in membrane association and phospholipid inhibition of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1995; 270 (24): 14705-14711.

Verma, S., & Anderson, T. J. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation.* 2002; 105 (5): 546-549.

Vilar, A., de Lemos, L., Patraca, I., Martinez, N., Folch, J., Junyent, F., . . . Camins, A. Melatonin suppresses nitric oxide production in glial cultures by pro-inflammatory cytokines through p38 mapk inhibition. *Free Radic Res.* 2014; 48 (2): 119-128.

Wakatsuki, A., Okatani, Y., Ikenoue, N., Shinohara, K., Watanabe, K., & Fukaya, T. Melatonin protects against oxidized low-density lipoprotein-induced inhibition of nitric oxide production in human umbilical artery. *J Pineal Res.* 2001; 31 (3): 281-288.

Wang, W. Z., Fang, X. H., Stephenson, L. L., Baynosa, R. C., Khiabani, K. T., & Zamboni, W. A. Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. *J Pineal Res.* 2005; 39 (1): 57-65.

Wang, X., Desai, K., Chang, T., & Wu, L. Vascular methylglyoxal metabolism and the development of hypertension. *J Hypertens.* 2005; 23 (8): 1565-1573.

Witt-Enderby, P. A., Bennett, J., Jarzynka, M. J., Firestine, S., & Melan, M. A. Melatonin receptors and their regulation: Biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* 2003; 72 (20): 2183-2198.

Wu, L. Is methylglyoxal a causative factor for hypertension development? *Can J Physiol Pharmacol.* 2006; 84 (1): 129-139.

Yamawaki, H., Saito, K., Okada, M., & Hara, Y. Methylglyoxal mediates vascular inflammation via jnk and p38 in human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 295 (6): C1510-1517.

Yaprak, M., Altun, A., Vardar, A., Aktoz, M., Ciftci, S., & Ozbay, G. Decreased nocturnal synthesis of melatonin in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2003; 89 (1): 103-107.

Yildiz, M., Sahin, B., & Sahin, A. Acute effects of oral melatonin administration on arterial distensibility, as determined by carotid-femoral pulse wave velocity, in healthy young men. *Exp Clin Cardiol.* 2006; 11 (4): 311-313.

Yu, L., Li, B., Zhang, M., Jin, Z., Duan, W., Zhao, G., . . . Yu, S. Melatonin reduces per-
eif2alpha-atf4-mediated endoplasmic reticulum stress during myocardial ischemia-
reperfusion injury: Role of risk and safe pathways interaction. *Apoptosis.* 2016; 21 (7):
809-824.

Zhang, S., Li, W., Gao, Q., & Wei, T. Effect of melatonin on the generation of nitric oxide in murine macrophages. *Eur J Pharmacol.* 2004; 501 (1-3): 25-30.

Zhang, W. H., Li, J. Y., & Zhou, Y. Melatonin abates liver ischemia/reperfusion injury by improving the balance between nitric oxide and endothelin. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2006; 5 (4): 574-579.

Zhou, H., Zhang, Y., Hu, S., Shi, C., Zhu, P., Ma, Q., . . . Chen, Y. Melatonin protects cardiac microvasculature against ischemia/reperfusion injury via suppression of mitochondrial fission-vdac1-hk2-mptp-mitophagy axis. *J Pineal Res.* 2017; 63 (1).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayşe Gül	Uyruğu	T.C.
Soyadı	GÖNEN	Tel no	05354723846
Doğum tarihi	22.02.1991	e-posta	aysegulgonen@yahoo.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Selçuklu Anadolu Lisesi/KONYA	2009
Lisans	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2014
Lisans	Akev Üniversitesi Gastronomi ve Mutfak Sanatları	2019-halen
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji ABD	2017-2020

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Mesul Müdür	Lara Anadolu Hastanesi	4 Ay (2016-2016)
Mesul Müdür	Aspendos Anadolu Hastanesi	1 Yıl 5 Ay (2016-2018)
Eczacı	Akdeniz Üniversitesi Hastanesi	(2018-halen)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL (2017)	56,25