

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



**DENEYSEL HİPERKOLESTEROLEMİDE
MELATONİNİN ATEROJENİK İNDEKS, OKSİDATİF
STRES, VASPİN, VİSFATİN DÜZEYLERİ VE
ENDOTELYUMA BAĞLI GEVŞEME CEVAPLARINA
ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Dilşad SEZGİN

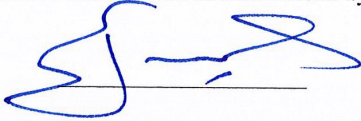
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Engin ŞAHNA

2016

ONAY SAYFASI

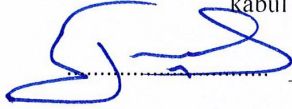
.....
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Engin SAHNA

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Engin SAHNA

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Zehra Yılmaz

Prof. Dr. Engin SAHNA

Doc. Dr. Selçuk İLHAN

.....

.....

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımda ve tezimin hazırlanmasında, bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, bilimsel kimliğini kendime örnek edindiğim, sabrı ve emeğiyle hep yanımda olan danışman hocam, Prof. Dr. Engin ŞAHNA'ya, çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Selçuk İLHAN'a laboratuvar çalışmalarımda önemli yardımlarını gördüğüm Prof.Dr. Kazım ŐAHİN, Doç. Dr. A.Osman ÇERİBAŐI, Prof. Dr. Necip İLHAN ve Arş. Gör. Dilek ATEŐŐAHİN'e ve eğitimim süresince hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezimin hazırlanmasında finansman desteği sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK proje no: 115S323) ve Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP proje no: TF.14.24)'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	ixi
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Kolesterol	7
3.2. Lipoproteinler	7
3.2.1. Şilomikronlar	8
3.2.2 Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (VLDL)	8
3.2.3. Orta Yoğunluklu Lipoproteinler (IDL)	8
3.2.4. Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (LDL)	9
3.2.5. Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler (HDL)	9
3.2.6 Aterojenik İndeks	10
3.3. Ateroskleroz	10
3.3.1. Arter Duvarının Yapısı	12
3.3.2. Aterosklerozun Patogenezi	13
3.3.3. Ateroskleroza Yol Açan Risk Faktörleri	17
3.3.4. Ateroskleroz, Oksidatif Stres ve İnflamasyon	18
3.3.4.1. Aterosklerozda MDA Oluşum Mekanizmaları	20
3.3.5. Ateroskleroz, Endotel Disfonksiyon ve ADMA	21
3.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	25
3.4.1. SOD	27
3.4.2. GSH ve GSSG	27
3.5. Karaciğer Fonksiyon Testleri (ALT, AST, GGT)	28
3.6. Adipoz Doku	30

3.6.1. Ateroskleroz ve Adipoz Doku	31
3.6.2. Vaspin	31
3.6.3. Visfatin	32
3.7. Melatonin	33
3.7.1. Melatonin Sentezi	34
3.7.2. Melatonin Farmakokinetiği	35
3.7.3. Melatonin Reseptörleri ve Etki Mekanizması	36
3.7.4. Melatoninin ve Oksidatif Stres	37
3.7.5. Melatonin ve Ateroskleroz	38
3.8. Statinler	40
3.8.1. Statinler ve Ateroskleroz	40
3.8.2. Statinler ve Oksidatif Stres	42
3.8.3. Atorvastatin	42
3.9. Çalışmanın Amacı	43
4. GEREÇ VE YÖNTEM	45
4.1. Deneş Hayvanları	45
4.2. Deneş Planı	45
4.3. Deneş Hayvanlarının Beslenmesi	46
4.4. Cerrahi uygulamalar	46
4.5. İn vitro deneyler	47
4.5.1. Fenilefrin kasılma cevapları	47
4.5.2. Asetilkolin gevşeme cevapları	48
4.6. Biyokimyasal analizler	48
4.6.1. Homojenatların Hazırlanması	48
4.6.2. Doku MDA Düzeylerinin Ölçümü	49
4.6.3. Doku GSH Düzeylerinin Ölçümü	51
4.6.4. Doku SOD Aktivitesi Ölçümü	52
4.6.5. Lipid Parametreleri ve Karaciğer Fonksiyon Testlerinin Ölçümü	53
4.6.6. Aterojenik İndeks	54
4.6.7. Serum ADMA ölçümleri	54
4.7. Doku Vaspin-Visfatin Ölçümü	54

4.8. Histopatolojik Metot	55
4.9. İstatistiksel Analiz	55
4.10. Kullanılan Kimyasallar	56
5. BULGULAR	57
5.1. Canlı Ağırlık Değişimleri	57
5.2. Torasik aortada kasılma-gevşeme cevapları	58
5.2.1. Fenilefrin kasılma cevapları	58
5.2.2. Asetilkolin gevşeme cevapları	59
5.3. Serum Lipid Parametreleri ve Aterojenik İndeks	60
5.4. Karaciğer Fonksiyon Testleri	63
5.5. Doku MDA Düzeyleri	65
5.5.1. Böbrek Dokusu MDA Düzeyi	65
5.5.2. Kalp Dokusu MDA Düzeyi	66
5.5.3. Karaciğer Dokusu MDA Düzeyi	66
5.6. Doku GSH Düzeyleri	67
5.6.1. Böbrek Dokusu GSH Düzeyi	67
5.6.2. Kalp Dokusu GSH Düzeyi	67
5.6.3. Karaciğer Dokusu GSH Düzeyi	68
5.7. Doku SOD Aktivitesi	69
5.7.1. Böbrek Dokusu SOD Aktivitesi	69
5.7.2. Kalp Dokusu SOD Aktivitesi	69
5.7.3. Karaciğer Dokusu SOD Aktivitesi	70
5.8. Serum ADMA ölçümleri	71
5.9. Doku Vaspın Ölçümleri	72
5.9.1. Aort Dokusu Vaspın Düzeyleri	72
5.9.2. Karaciğer Dokusu Vaspın Düzeyleri	73
5.10. Doku Visfatin Ölçümleri	74
5.10.1. Aort Dokusu Visfatin Düzeyleri	74
5.10.2. Karaciğer Dokusu Visfatin Düzeyleri	75
5.11. Histopatolojik Bulgular	76
5.11.1 Karaciğerde Mikroskopik Bulgular	76

5.11.2. Böbrekte Mikroskopik Bulgular	80
5.11.3. Aortta Mikroskopik Bulgular	84
6. TARTIŞMA	85
7. KAYNAKLAR	98
8. ÖZGEÇMİŞ	106



TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Kolesterol değerlerinin sınıflandırılması	10
Tablo 2.	Antiinflamatuvar ve proinflamatuvar adipokinler..	31
Tablo 3.	Deney grupları	45
Tablo 4.	Yem bileşimi	46
Tablo 5.	Sıçanların canlı ağırlıkları.	57
Tablo 6.	Fenilefrin kasılma cevapları E_{max} ve EC_{50} değerleri	58
Tablo 7.	Asetilkolin gevşeme cevapları E_{max} ve EC_{50} değerleri	59
Tablo 8.	Serum lipid parametreleri.	60
Tablo 9.	Karaciğer fonksiyon testleri.	63
Tablo 10.	Serum ADMA ölçümleri	71
Tablo 11.	Karaciğerde tespit edilen lezyonların gruplara göre şiddeti.	77
Tablo 12.	Böbreklerde tespit edilen lezyonların gruplara göre şiddeti.	81

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Lipoproteinlerin sınıflandırılması	8
Şekil 2.	Aterosklerotik süreç	14
Şekil 3.	Ox-LDL ve aterosklerotik plak evrimi	16
Şekil 4.	Hiperlipidemi ve aterosklerozisde endotel disfonksiyon	23
Şekil 5.	ADMA-kardiyovasküler risk faktörleri ilişkisi	25
Şekil 6.	Antioksidanların sınıflandırılması	28
Şekil 7.	Adipoz dokunun bazı metabolik etkileri	30
Şekil 8.	Pinelosit hücrelerindeki melatonin sentezi	35
Şekil 9.	MDA standart eğri grafiği	50
Şekil 10.	GSH standart eğri grafiği	51
Şekil 11.	Fenilefrin doz cevap eğrisi	58
Şekil 12.	Asetilkolin doz cevap eğrisi	59
Şekil 13.	Serum LDL düzeyleri.	61
Şekil 14.	Serum total kolesterol düzeyi.	61
Şekil 15.	Serum trigliserit düzeyi.	62
Şekil 16.	Serum HDL düzeyi.	62
Şekil 17.	Aterojenik indeks.	63
Şekil 18.	Serum ALT düzeyi.	64
Şekil 19.	Serum AST düzeyi	64
Şekil 20.	Serum GGT düzeyi.	65
Şekil 21.	Böbrek dokusu MDA düzeyi	65
Şekil 22.	Kalp dokusu MDA düzeyi.	66
Şekil 23.	Karaciğer dokusu MDA düzeyi.	66
Şekil 24.	Böbrek dokusu GSH düzeyi.	67
Şekil 25.	Kalp dokusu GSH düzeyi.	67
Şekil 26.	Karaciğer dokusu GSH düzeyi.	68
Şekil 27.	Böbrek dokusu SOD aktivitesi.	69
Şekil 28.	Kalp dokusu SOD aktivitesi.	69
Şekil 29.	Karaciğer dokusu SOD aktivitesi	70
Şekil 30.	Serumda ADMA düzeyleri.	71

Şekil 31.	Aort dokusu eş zamanlı ve son 2 hafta melatonin gruplarında vaspin düzeyleri.	72
Şekil 32.	Aort dokusu son 2 hafta melatonin ve atorvastatin gruplarında vaspin düzeyleri.	72
Şekil 33.	Karaciğer dokusu eş zamanlı ve son 2 hafta melatonin gruplarında vaspin düzeyleri.	71
Şekil 34.	Karaciğer dokusu son 2 hafta melatonin ve atorvastatin gruplarında vaspin düzeyleri.	73
Şekil 35.	Aort dokusu eş zamanlı ve son 2 hafta melatonin gruplarında visfatin düzeyleri.	72
Şekil 36.	Aort dokusu son 2 hafta melatonin ve atorvastatin gruplarında visfatin düzeyleri.	74
Şekil 37.	Karaciğer dokusu eş zamanlı ve son 2 hafta melatonin gruplarında visfatin düzeyleri.	73
Şekil 38.	Karaciğer dokusu son 2 hafta melatonin ve atorvastatin gruplarında visfatin düzeyleri.	75
Şekil 39.	Karaciğerde görülen lezyonların gruplarda görünümü HE x 50	78
Şekil 40.	Karaciğerde görülen lezyonların gruplarda görünümü HE x 200	79
Şekil 41.	Böbrekte görülen lezyonların gruplarda görünümü HE x 50	82
Şekil 42.	Böbrekte görülen lezyonların gruplarda görünümü HE x 200	83
Şekil 43.	Aortta görülen lezyonların gruplarda görünümü HE x 200	84

KISALTMALAR LİSTESİ

ADMA	: Asimertik Dimetil Arjinin
ACh	: Asetilkolin
ALT	: Alanin Amino Transferaz
AST	: Aspartat Amino Transferaz
ATOR	: Atorvastatin
CAT	: Katalaz
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
DDAH-1	: Dimetilarjinin Dimetilaminohidrolaz
GGT	: Gama Glutamil Transferaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Red	: Glutasyon Redüktaz
GP_x	: Glutasyon Peroksidaz
HCT	: Hiperkolesterolemi
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HMG-CoA:	: 3-hidroksi-3-metilglutaril KoA
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
KKH	: Koroner Kalp Hastalığı
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
L-NMMA	: Monometil Arjinin
MDA	: Malondialdehit
MEL	: Melatonin
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
Ox-LDL	: Okside LDL
Phe	: Fenilefrin
ROR	: Retinoid Yoksun Reseptör
ROS	: Reaktif Oksijen Ürünleri
SCN	: Suprakiazmatik Çekirdek
SD	: Spraque Dawley
SDMA	: Simetrik Dimetil Arjinin
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TK	: Total Kolesterol
TG	: Trigliserid

1. ÖZET

Nitrik oksit biyoyararlanımı, lipid profili ve oksidatif değişiklikler ile karakterize hiperkolesterolemi, ateroskleroz için önemli risk faktörlerinden biridir. Bu çalışmada, yüksek kolesterol ile indüklenen hiperkolesterolemide melatoninin lipid parametrelerine, aterojenik indekse, asimetrik dimetil arjinin (ADMA), malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH) düzeylerine, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesine karaciğer fonksiyon testlerine, in vitro α_1 adrenerjik uyarımla meydana gelen kasılma ve endotelyuma bağlı gevşeme cevaplarına, karaciğer ve aortta vaspin, visfatin düzeylerine ve histopatolojik değişimlere etkisinin incelenmesi amaçlandı. Ayrıca melatoninin bu etkileri atorvastatin ile karşılaştırıldı.

Sıçanlar 5 gruba ayrıldı (n:7). 8 hafta boyunca kontrol grubu normal yemle, diğer gruplar % 2 kolesterol ve % 0.5 kolik asit diyeti ile beslendi. Melatonin bir gruba kolesterol ile eş zamanlı verilirken, diğer gruba son 2 hafta uygulandı. Atorvastatin (10 mg/kg/gün) gavaj ile son 2 hafta uygulandı. Deney sonunda izole edilen torasik aort halkalarından fenilefrin (Phe) ile kasılma, asetilkolin (ACh) ile gevşeme yanıtları kaydedildi. Serum lipid parametreleri (trigliserit, total kolesterol, HDL, LDL) kit yardımıyla otoanalizörde ölçüldü. Karaciğer, böbrek ve aort dokularında histopatolojik incelemeler yapıldı. MDA ve GSH düzeyleri, SOD aktivitesi spektrofotometre ile, karaciğer ve aortta vaspin-visfatin düzeyleri Western-Blot ile serum ADMA düzeyleri HPLC ile ölçüldü.

Hiperkolesterolemi ile artan serum lipid parametreleri, aterojenik indeks ve karaciğer fonksiyon testleri ve ACh-EC₅₀ değerleri, ADMA düzeyi ve oksidatif değişiklikler melatonin ve atorvastatin uygulaması ile azaldı. Karaciğer ve aort

dokusunda hiperkolesterolemi grubunda görülen vaspin, visfatin düzeylerindeki değişimleri melatonin ve atorvastatin uygulamaları azalttı.

Melatoninin hiperkolesterolemide koruyucu ve tedavi edici etkilerinin olabileceği, atorvastatin ile benzer etkiler oluşturabileceği ve klinik olarak test edilebileceği düşünölebilir.

Anahtar Kelimeler: hiperkolesterolemi, melatonin, ADMA, oksidatif stres, vaspin, visfatin



2.ABSTRACT

Effects of Melatonin on Atherogenic Index, Oxidative Stress, Vaspin, Visfatin Levels and Endothelium-Dependent Relaxation Responses in Experimental Hypercholesterolemia

Hypercholesterolemia, characterized by nitric oxide (NO) bioavailability, lipid profile and oxidative stress changes, is one of the important risk factors for atherosclerosis. In this study, it was aimed to investigate effects of melatonin on lipid parameters, atherogenic index, ADMA, MDA, GSH levels, SOD activities, liver function tests, contractions of resulting in vitro α 1 adrenergic stimulation and endothelium-dependent relaxation responses, vaspin-visfatin levels in liver and aorta and also effects on histopathological changes in high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia. Also, effects of melatonin on these parameters were compared with atorvastatin.

Rats were divided into 5 groups (n:7). While Control group was fed with normal diet, other groups were fed with % 2 cholesterol and % 0.5 cholic acid diet for 8 weeks. Melatonin was administered both concurrently with cholesterol and only last 2 weeks. Atorvastatin (10 mg/kg) was administered by gavage only last 2 weeks. At the end of the experiment Phe-Ach responses from isolated thoracic aorta rings were recorded. Serum lipid parameters and liver function tests were measured in the autoanalyser according to appropriate kit protocol. Histopathological examinations were performed in liver, kidney and aorta tissues. The tissue, MDA, GSH levels; SOD activities were determined by spectrophotometry, vaspin and visfatin levels were detected by Western-Blot and serum ADMA levels were measured by HPLC.

Rising lipid parameters, atherogenic index, liver function tests, ACh EC₅₀ values ADMA levels and oxidative changes cause of hypercholesterolemia, decreased with melatonin and atorvastatin treatment. The changes of vaspin, visfatin levels in liver and aorta tissues were decreased by treating melatonin and atorvastatin treatments in hypercholestremia group.

It is thought to melatonin may have protective and therapeutic effect on hypercholestremia, and create similar effects with atorvastatin and test clinically.

Key words: hypercholesteremia, melatonin, ADMA, oxidative stress, vaspin visfatin,

3. GİRİŞ

Hiperkolesterolemi, başta ateroskleroz olmak üzere oksidatif stres, inflamasyon ve endotelial disfonksiyonu içeren kardiyak ve serebrovasküler hastalıklarla ilişkilidir (1). Yapılan prospektif ve epidemiyolojik çalışmalar, yüksek serum kolesterol düzeylerinin kardiyovasküler hastalıklara bağlı mortaliteyi artırdığını, tedavi yöntemleri ile serum kolesterol düzeylerinin düşürülmesinin ise mortaliteyi azalttığını göstermiştir (2).

Aterosklerozun oluşmasında ilk basamağın endotel disfonksiyonu gelişmesi olduğunu gösteren deneysel kanıtlar elde edilmiştir. Diyabetli veya esansiyel hipertansiyonlu hastalarda olduğu gibi hiperkolesterolemide de yapısal damar değişiklikleri veya klinik semptomlar ortaya çıkmadan çok önce, damar endotel fonksiyonu bozulur (3).

Endojen ve kompetitif nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü olan ADMA, L-arginin'in hücre içine alınımını engelleyerek NO sentezinde azalmaya neden olur. Ortamda NO azalması, endotelial bağımlı vazodilatasyonun bozulmasına ve endotelial disfonksiyon gelişmesine neden olur. Hiperkolesterolemi ve koroner arter hastalığı olan insanlarda serum ADMA seviyeleri artar. Artan kolesterol seviyelerinin ADMA'nın artmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde ADMA'nın rolü ile ilgili artan bilgiler onun yeni tedavi stratejilerinin hedefi olabileceğini düşündürmektedir (3).

Aşırı oksidatif stres veya antioksidan potansiyelin yetersizliğinde gözlenen oksidatif hasar sonucu, lipid peroksidasyon ürünü MDA düzeyi artarken, antioksidan GSH düzeyi ve SOD aktivitesi azalmaktadır. Bu moleküllerin birçok kardiyovasküler olayda rol oynadığı bilinmektedir (4).

Visfatinin endotelial disfonksiyon ve ateroskleroz gelişimine neden olan proinflamatuvar özellikleri keşfedilmiştir. Visfatinin damarlar üzerine hem akut hem de kronik etkileri vardır. Obezite ve tip 2 diyabet gibi kronik hastalıklarda yüksek visfatin düzeyleri endotelial disfonksiyon, anjiogenez ve aterosklerotik plak bozukluğuna sebep olurken, akut visfatin tedavisi endotelial hücrelerde eNOS ekspresyon ve aktivitesini artırır ve direk olarak kardiomyositleri akut iskemi-reperfüzyon hasarına karşı korur. Koroner arter hastalarının plak rüptür bölgelerinde visfatin ekspresyonunun yüksek olduğu görülmüştür (5, 6).

Vaspin aterosklerozun daha kötüleşmesini engellemeyi amaçlayan bir adipokinin olduğu bildirilmiştir Vaspinin insülin duyarlı etkileri aracılığıyla vasküler endotelial hücrelerde serbest yağ asitlerinin neden olduğu apoptozisi önleyebildiği gösterilmiştir (8). Düşük vaspin düzeyleri ile ateroskleroz gelişimi ve ilerlemesi arasında ilişki olduğu görülmüştür. Vaspin adipokinleri ve vasküler hücrelere bağlı sitokinleri azaltarak inflamatuvar süreci inhibe edebilir. Hiperkolesterolemide vaspin ve visfatinin etkileri ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Bu adipokinler, aterosklerozu önleyici tedaviler açısından hedef haline gelebilir (7).

Melatonin seviyesi kardiyovasküler hastalıklarda düşer ve buna bağlı olarak endotel disfonksiyonu meydana gelir. Melatoninin; antihipertansif, antiiskemik ve antioksidan özellikleri kardiyovasküler patolojilerin tedavisinde ve önlenmesinde etkili olabileceğini düşündürmektedir (8).

Yapılan çalışmalarda yüksek kolesterol diyeti ile beslenen sıçanlarda melatonin uygulamasının kan kolesterol düzeylerinin düşmesine (9), kolesterol metabolizmasının düzenlenmesine ve oksidatif hasarın önlenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (10).

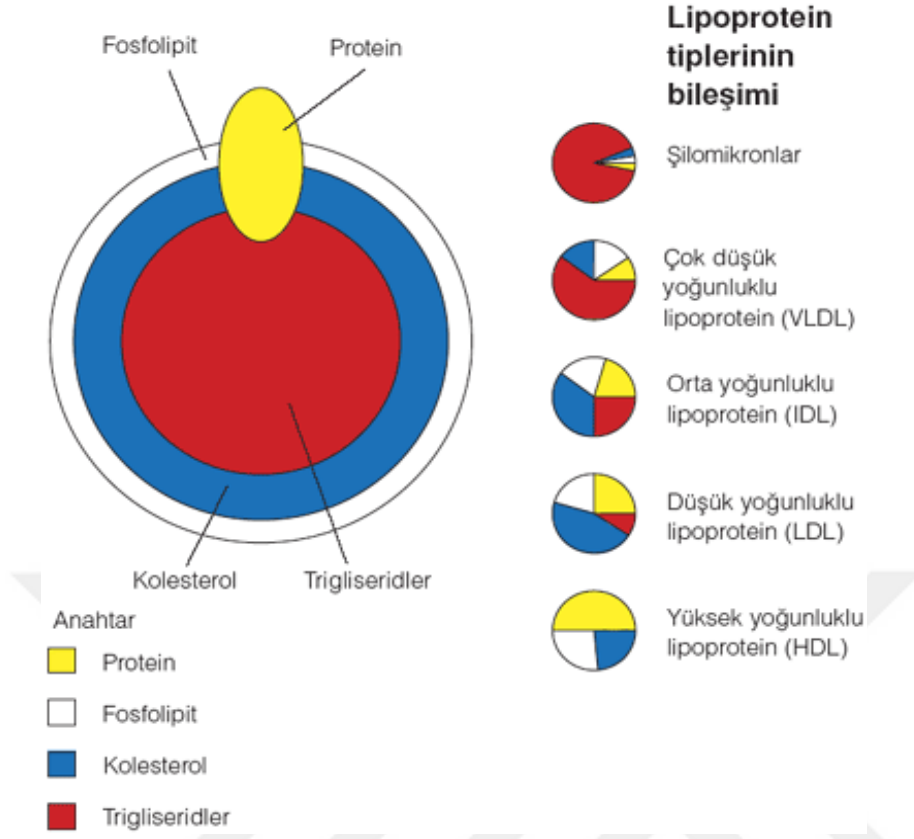
3.1. Kolesterol

Kolesterol, hayvan dokularının karakteristik steroid alkolüdür. Dokularda ve plazmada lipoproteinlerin içerisinde serbest kolesterol veya uzun zincirli yağ asiti ile birleşmiş olarak kolesteril esteri halinde bulunur. Birçok dokuda asetil-KoA'dan sentezlenir ve sonunda safrada, kolesterol veya safra tuzları halinde atılır. Ayrıca kolesterol membranların akışkanlığını düzenler. Kortikosteroidler, cinsiyet hormonları, safra asitleri ve D vitamini gibi diğer tüm steroidlerin öncüsüdür (11).

Hem kolesterolü hücrelere taşıyan düşük dansiteli lipoproteinler (LDL), hem de trigliseridleri taşıyan çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL) ateroskleroz oluşumunda önemli rol oynarlar. Buna karşılık yüksek dansiteli lipoproteinlerin (HDL) aterosklerozun gelişimi ile ters yönde etkileşimi olduğu saptanmıştır (12).

3.2. Lipoproteinler

Lipoproteinlerin genel işlevi, suda çözünmeyen lipidlerin, çözünür lipid ve protein kompleksi şeklinde kanda taşınmalarını sağlamaktır. Lipoproteinler, çekirdeklerinde hidrofobik lipidler (trigliserid ve kolesterol esterleri) içeren, protein yüzey tabakalarında ise serbest kolesterol ve fosfolipidler (daha hidrofilik yapıtaşları) taşıyan küresel parçacıklardır (13).



Şekil 1. Lipoproteinlerin sınıflandırılması

3.2.1. Şilomikronlar

Şilomikronlar plazma lipoproteinlerinin en büyükleridir. %98-99 oranında lipid ve %1-2 proteinden oluşurlar. Triglisericidlerle beraber hem fosfolipidler hem de kolesterol büyük şilomikron partiküllerinin yapımında kullanılırlar (14).

3.2.2 Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (VLDL)

%85-90 arasında lipid (%55 triglisericid, %20 kolesterol, %15 fosfolipid) ve %10-15 protein içerir. VLDL karaciğerde yapılır ve üretimi hepatositlere yağ asidi sağlanmasıyla uyarılır (15).

3.2.3. Orta Yoğunluklu Lipoproteinler (IDL)

Normal olarak plazmada çok düşük konsantrasyonlarda bulunur; büyüklük ve içerik açısından VLDL ve LDL arasında yer alır. VLDL'nin katabolizma ürünü,

LDL'nin öncülüdür. LDL reseptörü ile uzaklaştırılır. Sıklıkla bir tip VLDL artığı olduğu ve aterojenik olduğu düşünülür (16).

3.2.4. Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (LDL)

Plazmada başlıca kolesterol taşıyıcı lipoproteindir; total plazma kolesterolünün yaklaşık %70'i LDL'dedir. LDL yaklaşık %75 lipid (%35 kolesterol esteri, %10 serbest kolesterol, %10 trigliserid ve %20 fosfolipid) ve %25 proteinden oluşur. Yaklaşık %75 LDL alımı, hepatositlerce sağlanır. LDL'nin aterojenik olduğu bilinmektedir (17).

3.2.5. Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler (HDL)

HDL, çapı küçük partiküllerdir. Yaklaşık %50 lipid (%25 fosfolipid, %15 kolesterol esterleri, %5 serbest kolesterol, %5 trigliserid) ve %50 proteinden oluşur. HDL, lipidlerin lipoproteinler ve hücreler arasında dağılımını sağlar. Diğer lipoproteinlerden veya aşırı kolesterolü olan hücre zarlarından mükemmel serbest kolesterol alıcılarıdır ve atılım için karaciğer veya kolesterole ihtiyacı olan hücrelere aktarır. Bir miktar HDL de karaciğer tarafından alınarak yıkıma uğratılır (18).

National Cholesterol Education Program (NCEP), Adult Treatment Panel (ATP) III kılavuzuna göre kolesterol değerlerinin sınıflandırılması aşağıda belirtilmiştir;

Tablo 1. Kolesterol değerlerinin sınıflandırılması

Lipoprotein	Düzy (mg/dl)	Sınıflandırma
LDL Kolesterol	<100	Optimal
	100-129	Sınırdadır
	130-159	Sınırdadır yüksek
	160- 189	Yüksek
	≥190	Çok yüksek
Total Kolesterol (TK)	< 200	İstenen Düzy
	200-239	Sınırdadır Yüksek
	≥ 240	Yüksek
Trigliserit (TG)	<150	Normal
	150-199	Sınırdadır yüksek
	200-499	Yüksek
	≥500	Çok yüksek
HDL Kolesterol	<40	Düşük
	≥60	Yüksek

3.2.6 Aterojenik İndeks

Son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle lipoproteinlerin partikül büyüklüğü üzerine yoğunlaşmıştır. Küçük ve yoğun LDL partikülleri aterogenez açısından güçlü bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Yine bu profile sahip hastalarda, yüksek trigliserit (TG) ve düşük HDL düzeyleri ile beraber küçük, yoğun LDL düzeyleri arasında kuvvetli bir ilişki saptanmıştır (16). Bu nedenle aterojenik indeksin belirlenmesi aterosklerotik kronik kalp hastalığı (KKH) riskini belirlemede önemli bir ölçümdür ve koroner darlığı saptanan hastaları normal bireylerden ayırmada bir kriter olarak değerlendirilebilir.

3.3. Ateroskleroz

Ateroskleroz, hücrel ve humoral immun cevabın katıldığı orta büyüklükte ve daha büyük arterlerin kalınlaşması ve sertleşmesi sonucu damar lümeninin aterosklerotik plaklarla daralması ile oluşan inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (19).

Aterogenezis çocukluk ve ergenlik döneminde yavaş ilerleme gösterirken; erişkin yaşamda ise daha hızlı bir progresyona ulaşarak yüksek morbiditeye ve ölümcül olabilen klinik durumlara yol açar. Erken başlayan değişikliklerden aterom plağına kadar, genetik

ve çevresel faktörler, oksidize olmuş LDL' nin (ox-LDL) lokal ve sistemik düzeyleri, inflamatuvar kemokinler, vasküler adezyon molekülleri, serbest radikaller, inflamatuvar hücreler, endotele ait diğer faktörler (NO, ADMA) ve büyüme faktörleri sorumlu görünmektedir (20).

Kan kolesterol düzeylerinin düşürülmesinin KKH riskini azaltması yanında periferik arterlerdeki ve koroner arterlerdeki mevcut aterosklerotik lezyonların gerilemesini de sağlayabileceği bugüne kadar yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (20).

Plazmanın TG düzeyinin veya trigliseritten zengin plazma lipoproteini türü olan VLDL içindeki kolesterol fraksiyonunun yüksekliği ile KKH arasında bağımsız bir ilişki olduğu kesin olarak gösterilmiş değildir; ancak aralarındaki ters orantı nedeniyle trigliseritten zengin lipoproteinlerin artmasına HDL kolesterol konsantrasyonu azalması eşlik ettiği için, arada dolaylı bir ilişki de vardır. VLDL'nin aterogeneze katkısında plazmadaki düzeyinden çok, VLDL partikülünün büyüklüğünün ve alt-tipinin rol oynadığı düşünülmektedir. HDL düşüklüğü, ateroskleroz için bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (21).

Plazmada TK, LDL ve HDL ile ateroskleroz arasındaki ilişkiyi gösteren birkaç bulgu şöyledir:

i) Özellikle koroner hastalığı olan hastalar sağlıklı insanlara oranla daha yüksek serum kolesterol düzeyi gösterirler.

ii) Serum kolesterol düzeyi yüksek olan toplumlarda ateroskleroz ve onun komplikasyonları daha sık görülür. Serum kolesterol düzeyi, yaşına göre, toplumun en üst beşte-birinde (yaklaşık 230 mg/dL' nin üstünde) bulunan orta yaşlı erkeklerde 65 yaşından önce koroner arter hastalığından ölüm ("koroner ölümü") riski yaklaşık

% 10 olduğu halde, kolesterol düzeyi, en alt beşte-birde (yaklaşık 170 mg/dL'nin altında) bulunanlarda risk %3 tür.

iii) Plazma LDL kolesterol düzeyindeki her 30 mg/dL' lik bir değişme (artma veya azalma) KKH riskini yaklaşık %30 oranında değiştirir.

iv) HDL kolesterol düzeyindeki her 5 mg/dL' lik artmanın bu riski yaklaşık % 10 azalttığı kaydedilmiştir.

v) Deney hayvanlarını kolesterolden zengin olan ve böylece serum kolesterol düzeyini arttıran diyetle beslemek suretiyle, onların arterlerinde aterosklerotik lezyonlar oluşturmak mümkündür.

vi) Aterosklerozlularda intima altında toplanan, kolesterolden zengin lipidlerin oluşturdukları aterom plaklarında lipid bileşimi, serumdaki lipidlerin bileşimine paralellik gösterir (21).

3.3.1. Arter Duvarının Yapısı

Arter duvarı genel olarak 3 tabakadan oluşmaktadır.

Tunika İntima (İç tabaka): İçte endotel hücre dizisi, bunun altında bazal lamina ve gevşek bir fibroelastik bağ dokusundan oluşan subendotelial tabakadan meydana gelir (22).

Tunika Media (Orta tabaka): Arter duvarının en geniş tabakasıdır. Hücreler arasında dağılmış elastik ve kollajen fibriller ile proteoglikanlar bulunur. Ekstrasellüler matriks düz kas hücrelerince oluşturulur (22).

Tunika Adventisya (Dış tabaka): En dış tabaka olan tunika adventisyanın, arter dengesi ve patolojisinde çeşitli rolleri vardır. Daha çok uzunlamasına düzenlenmiş kollajen ve elastik fibrillerden oluşan bir bağ dokusu yapısındadır. İç

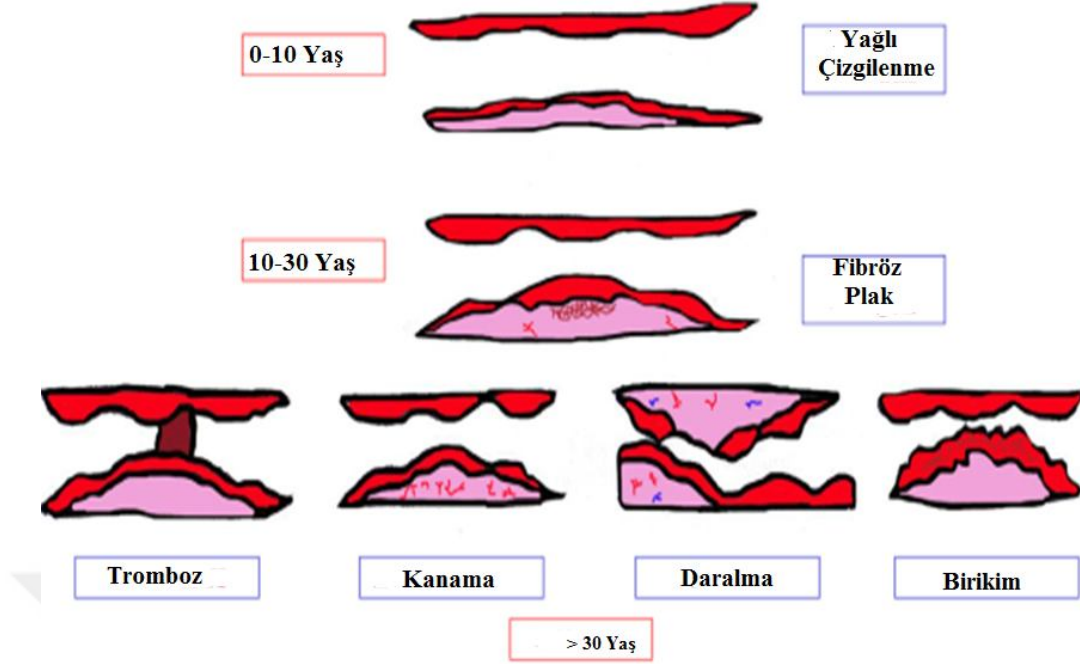
kısmı fibrözdür ve ön planda kollajen ve elastinden oluşur. Adventisya liflere ek olarak fibroblastlar, mast hücreleri, adipositler ve sempatik sinir uçlarını içerir (22).

Endotel Hücreleri: Arterin intima bölgesinde bulunan endotel hücreleri, kan ile teması sağlayan yüzeyi oluşturur. Endotel hücreleri, ateroskleroz gibi arter hastalıklarında bozulan, ileri düzeyde düzenlenen ana bir mekanizmaya sahiptir ve uzun süreli temaslar sırasında kanı sıvı durumda tutabilecek yüzeylerden birini sağlayabilmektedir (23).

Düz Kas Hücreleri: Büyük aterosklerotik arter tiplerinde, anormal düz kas kasılması, kan akışını bozan bir ateroskleroz komplikasyonu olan vazospazma neden olabilmektedir. Düz kas hücreleri, normal vasküler homeostazında olduğu gibi aterosklerotik lezyonların oluşumu ve gelişiminde kilit bir rol oynayan ekstraselüler matriksi sentezlemektedir. Bu hücreler göç ederek ve proliferasyonla aterosklerozun intimal hiperplastik lezyon oluşumuna katkı sağlarlar (23).

3.3.2. Aterosklerozun Patogenezi

Aterosklerotik patojenik süreç hayatın erken döneminde, doğum sonrası gelişim ve olgunlaşma döneminde başlar ve tromboz, kanama, birikim, daralma gibi birkaç sonuç şeklinde ömür boyunca kademeli olarak ilerleyebilir (24) (Şekil 2).



Şekil 2. Aterosklerotik süreç

Aterosklerotik plağın patojenik sürecin aşamaları ilerleyici ve ciddiyetini yansıtan lezyonları altı ana gruba ayrılarak histolojik olarak karakterize edilmiştir. Damar duvarında adaptif intima kalınlaşması gibi fizyolojik değişikliklerin rolünü de dikkate alan histopatolojik sınıflandırma; morfolojik değişikliklerin ve klinik sonuçların daha anlaşılır olmasını sağlamaktadır (25).

En erken histopatolojik değişiklik endotel tabakasının adaptif kalınlaşma (tip I lezyon) 'dir. Bir tip I lezyon yalnızca mikroskopi ve/veya kimyasal analizi kullanılarak tespit edilebilir ve temel olarak çocuklarda koroner arterlerde ve zaman zaman genç yetişkinlerin arterlerin daha az hassas bölgelerinde görülmektedir. Tip II lezyonda, makrofaj köpük hücreleri daha fazla sayıdadır ve arterlerin iç yüzeyinde sarı, yüzeyden kabarık çizgi olarak yağlı çizgilenmeler şeklinde görünürler. Lipidler makrofaj ve T hücrelerinin altında lezyonun en derin bölgelerinde birikir ve tip III lezyon oluşur. Bu lezyonlar zaman içerisinde mutlaka aterom plağına dönüşürler. Tip

IV lezyon, arter lümeninin lipid çekirdeğın nispeten ince bir doku ayrımı ile tanımlanırken, bir tip V lezyonu ayrıca aterosklerotik kapak olarak da bilinen, bir elyafly kalınlaşma sergiler. Tip VI lezyon genellikle kendi rüptürüyle sonuçlanan fissürler, ülser ve böylece ateroskleroz ile ilişkili kardiyovasküler hastalıklar ile karmaşık bir plak yapısı gösterir (25).

Yağ çizgisi oluşumu: Çocukluk döneminde görülmeye başlarlar. Patolojik olarak kolesterol esterleri çevresindeki düz kas hücresi topluluklarından ibarettirler. Tıkanmaya yol açmazlar ve semptom vermezler. Bu lezyonlar kendiliğinden kaybolabilir veya aterom plaklarına dönüşebilir. İnflamatuvar hücrelerde üretilen ürünler lipidlerin modifikasyonunda rol oynarlar (26).

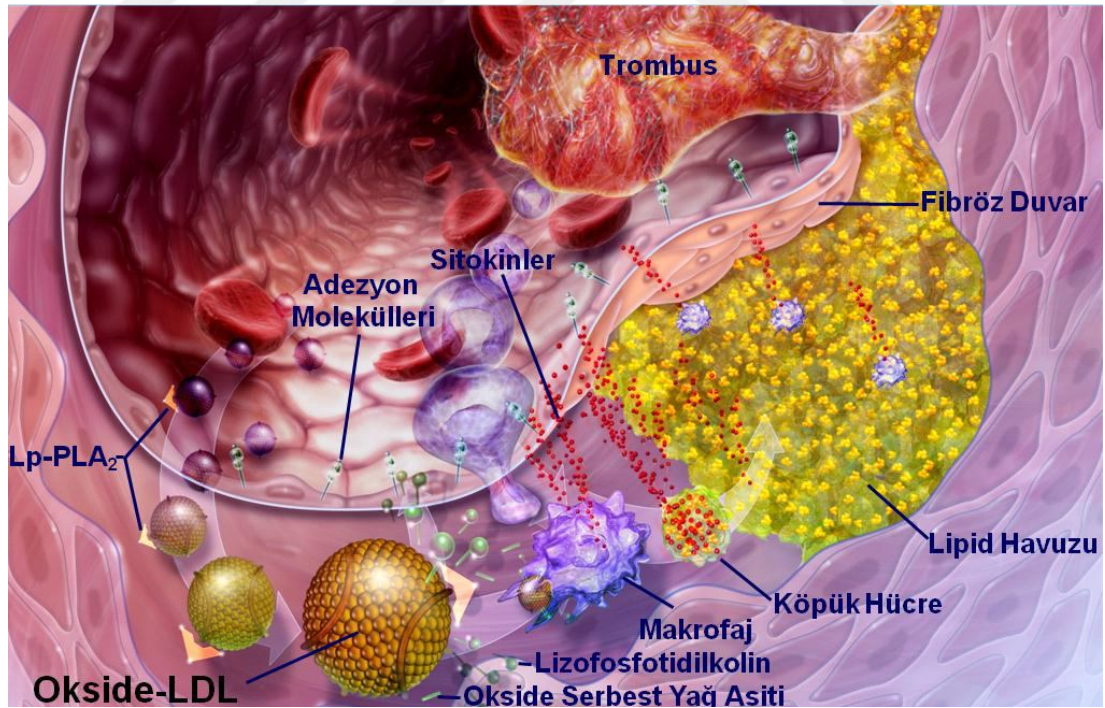
İnflamatuvar hücrelerin adezyonu ve migrasyonu: Normal şartlarda endotel hücreleri (EH) lökosit adezyonuna karşı dirençlidir. Proinflamatuvar uyarı, satüre yağlardan yüksek olan bir diyet, hiperkolesterolemi, obezite, hiperglisemi, insulin direnci, hipertansiyon ve sigara içimi, P-selektin ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1), interselüler adezyon molekülü (ICAM-1) gibi adezyon moleküllerinin endotelyal ekspresyonlarını artırmaktadır. Aterosklerozda özellikle NO gibi endotelyal ateroprotektif moleküllerin aktivitesi azalırken VCAM-1 ekspresyonu artmaktadır. Bu durum dolaşımdaki monosit ve T lenfositlerin bağlanmasına aracılık etmektedir (27).

Köpük hücre oluşumu: Makrofajlar köpük hücrelerin oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Bu hücreler modifiye LDL'yi hücre içine alarak ateroskleroz için karakteristik olan köpük hücrelerini oluştururlar (27).

Fibröz plak gelişimi: Düz kas hücreleri subendotelyal aralığa göç eder, bölünürler ve ekstraselüler matriksi sentezlerler. Lezyonun lipid dolu çekirdeğini

endotel yüzeyinden ayıran fibröz bir şapka oluşur. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), interlökin I (IL-1) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) plak gelişim ve komplikasyonunda rol oynayan lokal büyüme faktörlerinin üretimini artırmaktadırlar. Endotel yüzeyinden fiziksel olarak ayrılan lipid çekirdek ve plak stabilize olur, bunun sonucunda arter lümeni daralması gözlenebilir (27).

Komplike lezyon gelişimi: Fibröz plakta kalsifikasyon ve ülserasyon görülür. Daha sonra plağın fissüre veya rüptüre olmasının ardından kanama meydana gelir. Oluşan inflamatuvar immün aktivasyon plak yırtılmasını sağlayarak ve doku faktörü ekspresyonunu aktive ederek trombozun başlamasına neden olur. Komplike lezyonlar miyokard infarktüsü veya inme gibi klinik tabloların ortaya çıkmasından sorumludurlar (27).



Şekil 3. Ox-LDL ve aterosklerotik plak evrimi (28)

3.3.3. Ateroskleroza Yol Açan Risk Faktörleri

Miyokard infarktüsünü önlemede bu hastalığa genetik eğilim taşıyan bireylerin önceden belirlenmesi ve varsa ek risk faktörlerinin etkili şekilde tespit edilmesi tedavide yararlı olabilir.

Ulusal Kolesterol Eğitim Programı (National Cholesterol Education Program, NCEP) katılımcıları, III. Yetişkin tedavi panelinde (Adult treatment panel, ATP III), koroner arter hastalığı risk faktörlerini şu şekilde sınıflandırmıştır (29).

Koroner Arter Hastalığı Risk Faktörleri (NCEP ATP III) :

1. Lipid risk faktörleri (LDL, Trigliseridler, Non-HDL Kolesterol, HDL düşüklüğü, Aterojenik dislipidemi)

2. Nonlipid risk faktörleri

A. Modifiye edilebilen risk faktörleri

- a. Hipertansiyon
- b. Sigara içiyor olmak
- c. Tip II Diyabet

B. Modifiye edilemeyen risk faktörleri

- a. Yaş
- b. Erkek cinsiyeti
- c. Ailede erken koroner kalp hastalığı öyküsü

Koroner Arter Hastalığı İçin Bağımsız Risk Faktörleri (NCEP ATP III) :

1. Yaş (erkeklerde ≥ 45 , kadınlarda ≥ 55)
2. Ailede erken koroner kalp hastalığı öyküsü
3. Sigara içiyor olmak

4. Hipertansiyon (Kan basıncı $\geq 140/90$ mmHg veya antihipertansif ilaç kullanımı)
5. Düşük HDL kolesterol (HDL < 40 mg/dl)
6. Yüksek LDL kolseterol (LDL ≥ 130 mg/dl)

3.3.4. Ateroskleroz, Oksidatif Stres ve İnflamasyon

Aerobik organizmalarda serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Ancak bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar. Oluşan serbest radikaller, aralarında ateroskleroz, kalp hastalıkları, kanser, serebrovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet, akut renal yetmezlik, akciğer hastalıkları, amfizem, bronşit ve alkolik karaciğer hastalıkları gibi yaşlanmaya bağlı dejeneratif bozuklukların da yer aldığı patolojik durumların oluşumuna katkıda bulunurlar (30).

Vasküler ROS'un (reaktif oksijen türleri) mitokondriyal solunum döngüsü, araşidonik asit, ksantin oksidaz, NO sentezini kapsayan çok fazla potansiyel enzimatik kaynakları vardır. ROS üreten hücreler, damar düz kas hücreleri ve NADPH oksidazlar aterojenizde önemli rol oynar (30).

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipid peroksidasyonunun toksik olduğu bilinmektedir (30).

Serbest radikaller, endotelyumun altındaki monositlerin göçüne öncülük eden oksidatif olarak değiştirilmiş plazma LDL'lerine saldırır. Aktive edilmiş endotelyum,

ox-LDL partiküllerini yutan makrofajlara ve lipid parçacıklarına daha geçirgen olur. Bu durum aterojenik patojenik süreçte rol oynayan inflamatuvar sitokin üretiminde ve oksidatif strese artışa neden olur. İmmun yanıt, hızla çoğalan damar düz kas hücrelerini, matriks birikimini, fibröz kapak üretimini ve inflamatuvar hücre ve platelet istihdamını ve aktivasyonunu harekete geçirir (31).

Lipid peroksidasyon ürünleri olarak açığa çıkan lipid peroksitleri, hidroperoksitleri membran yapısına doğrudan, diğer hücre bileşenlerine ise aldehit üreterek dolaylı olarak zarar verir. Bu da pek çok hastalığın ve doku hasarının oluşmasına neden olur. Membran yapısının bozulması sonucu malondialdehit (MDA) oluşur (32).

Vücudumuzda oluşabilen radikallerin sayısı yüzlerce farklı tür şeklinde ifade edilebilse de, bu radikaller arasında süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalının önemli yerleri vardır (32).

Okside LDL'nin potansiyel proaterojenik aktiviteleri;

- ❖ Okside LDL makrofajların köpük hücrelerine dönüşümünü destekler.
- ❖ Okside LDL türevleri T lenfositler ve makrofajlar için birer kemotaktik faktör gibi davranır.
- ❖ Okside LDL türevleri sitotoksiktir aynı zamanda apoptozu indükler.
- ❖ Okside LDL düz kas hücreleri ve makrofajlar için mitojeniktir.
- ❖ Okside LDL damar hücrelerinden inflamatuvar gen ekspresyonunu artırır.
- ❖ Okside LDL makrofajlardan scavenger reseptor üretimini artırır.
- ❖ Okside LDL immünojeniktir ve T hücrelerini aktive ederek antikor oluşumunu sağlar.

- ❖ Okside LDL trombosit agregasyonu ve doku faktörü ekspresyonunu arttırır.
- ❖ Okside LDL, CRP'ye bağlanarak kompleman sistemin aktivasyonuna neden olur.
- ❖ Okside LDL ürünleri NO biyoaktivitesini bozar (33).

3.3.4.1. Aterosklerozda MDA Oluşum Mekanizmaları

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur. Aterosklerozda kan MDA düzeylerinde artış görülmüştür. MDA düzeyinde artış serbest oksijen radikal oluşumu ile ilişkilidir ve hiperlipideminin sonucudur. MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır (34).

MDA; proteinlerin, fosfolipidlerin ve nükleik asitlerin serbest amino gruplarıyla reaksiyona girerek hem molekül içi hem de moleküller arası 1-amino-3 iminopropen (AIP) köprüleri oluşturarak hem yapısal hem de fonksiyonel değişikliklere sebep olur. Bunun sonucu oluşan moleküller yabancı madde gibi algılanırlar ve neticede otoimmün cevap oluştururlar. Oluşan otoimmün yanıt çeşitli hastalıkların öncüsü veya sonucu olabilir. Özellikle diyabet, hiperlipidemi, ateroskleroz, alzheimer, apopleksi ve karaciğer hastalıkları lipid peroksidasyonun

fazlaca görüldüğü rahatsızlıklardır. MDA oluşumunun yanı sıra lipid peroksidasyonuna sebep olan faktörler, lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi hücrel enzimleri uyarak kronik inflamasyon oluşmasına sebep olurlar (34).

MDA, LDL ve ox-LDL'ye ilaveten, çeşitli pro-inflamatuvar ve pro-aterojenik süreçlere aracılık etmekte ve bunların sonucu olarak köpük hücre oluşumuna yol açmaktadır. Koroner arter hastaları ile normal bireyler karşılaştırıldığında, ox-LDL ve MDA ile değişime uğrayan LDL'nin plazma seviyeleri koroner arter hastalarında anlamlı yüksek tespit edilmiştir (34).

3.3.5. Ateroskleroz, Endotel Disfonksiyon ve ADMA

Hiperkolesterolemi ile endotelyal fonksiyon bozulur ve bu fonksiyon bozukluğu, ateroskleroz gelişiminin ilk ve en önemli göstergesidir. Endotelyum, vasküler tonusu, hücre çoğalmasını, trombositlerin ve lökositlerin damar duvarı ile etkileşimini düzenleyen, tromboregülatör molekülleri ve büyüme faktörlerini sentezleyebilen, fiziksel ve kimyasal uyarılara yanıt verebilen vasküler düz kas ile damar lümeni arasında uzanan bazal membran üzerinde yerleşmiş tek sıralı yassı epitel hücrelerden oluşan bir dokudur (35).

Endotel hücreleri gevşemeyi (relaksasyon) ve kasılmayı (kontraksiyon) sağlayan faktörleri üreterek fizyolojik ve patolojik uyarılara karşı damar tonus değişmelerini düzenler, dolaşım homeostazisini sağlar. Hücre çoğalmasında (proliferasyon) inflamatuvar ve immun olayların gelişmesinde rol oynar. Normal bir endotel, kanın rahat akımı için, hücrelerin yapışmadığı bir damar yüzeyi sağlar. Antikoagülan, fibrinolitik ve antitrombotik moleküller üretir (35).

Endotele bağlı gevşeme ateroskleroz ve hiperkolesterolemi varlığında bozulmaktadır. Özellikle LDL artışı doğrudan endotelinin uyarıcısı olarak endotele

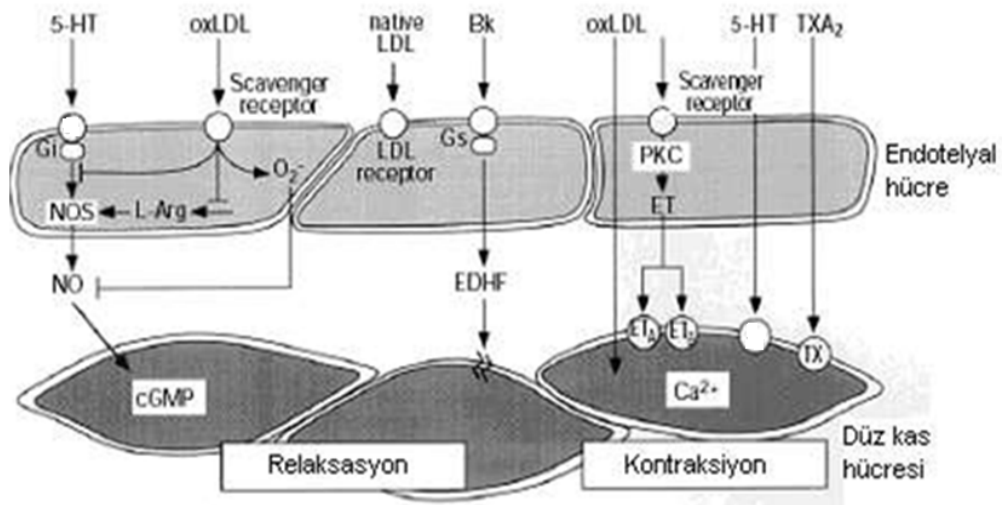
bağlı gevşemeyi olumsuz etkiler. Bu olayda pek çok mekanizma rol oynamaktadır. Endotelial uyarı değişikliği ve G proteinlerine bağlı NO yapımının engellenmesi, serbest oksijen radikalleri yapımının artması, L-arjinin etkinliğinin azalması, endotelin (ET) üretiminin artması bunlardan birkaçıdır (35).

Endotel kaynaklı NO, bilinen en potent endojen vazodilatördür. NO kan akımı ve basıncının önemli bir düzenleyicisidir. Etkisini çözünür guanilat siklazın uyarılması ile siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşturarak göstermektedir. Hücre içinde cGMP miktarı artar. Bu da miyozin hafif zincirlerini defosforile eder. İntraselüler kalsiyum azalır ve vazodilatasyon oluşur. Kan akımının damarlara yaptığı mekanik kuvvet sonucu endotelden salınır ve akım aracılı vazodilatasyonda önemli bir rol oynar. NO'nun endotelden salınması ile norepinefrin, endotelin (ET), anjiotensin II ve serotoninin vazokonstriktör etkilerine karşı koymaktadır. Endotelial NO sentaz (eNOS)'ın farmakolojik inhibisyonu veya genetik yetersizliği endotelium bağımlı vazodilatasyonu bozmaktadır ve vasküler direnci artırmaktadır (35).

Hiperkolesterolemi, NO'ya bağlı damar relaksasyonunu bozar. Hiperkolesterolemi, hem NO yapımını azaltır, hem de NO'nun aterojenezdeki inflamasyon nedeni ile oluşan oksijen radikalleri tarafından inaktive edilmesine neden olur. Kolesterol arttıkça NO inhibisyonu giderek hızlanır ve NO biyoyararlanımı azalır (35).

Hiperlipidemi ve aterosklerozda ET yapımı artmıştır. ET'ler, 21 aminoasitten oluşan vazokonstriktör peptidlerdir. Başlıca endotelde üretilirler ve damarların homeostazının (iç denge) düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar. Lipoproteinler, endotel hücrelerinde endotelin yapımını, gen ekspresyonunun artışına sebep olarak arttırır. Yapılmış olan deneysel çalışmalarda ateroskleroz plakları ve

neovaskularizasyonun olduğu hiperselüler bölgelerde ET aktivitesi artmış olarak saptanmıştır. Makrofaj infiltrasyonunun bulunduğu alanlarda da ET düzeyinin yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar aterosklerozun olduğu bölgelerde ET aktivitesinin yüksekliği ile aterosklerozun ilerlemesi ve komplikasyon gelişimi birlikteliğini düşündürmektedir (36).



Şekil 4. Hiperlipidemi ve aterosklerozisde endotel disfonksiyon (35)

Okside LDL, scavenger (çöpcü) reseptörlerle aktive edilerek L-arjinin-NO yolunu bozar. Ayrıca süperoksit radikallerini artırarak NO işlevini bozar ve protein kinaz C (PKC)'yi aktive ederek ET artışına neden olur (35).

NO sentezi için kullanılan öncül biyomolekül arjinin amino asididir. Translasyon sırasında proteinlerin yapısına giren arginin, postranslasyonel modifikasyonla metillenebilir ve metillenmiş çeşitli arginin türleri oluşabilir. Metilargininler 3 şekilde bulunur; Asimetrik dimetilarginin (ADMA), Simetrik dimetilarginin (SDMA), Monometilarginin (L-NMMA) (37).

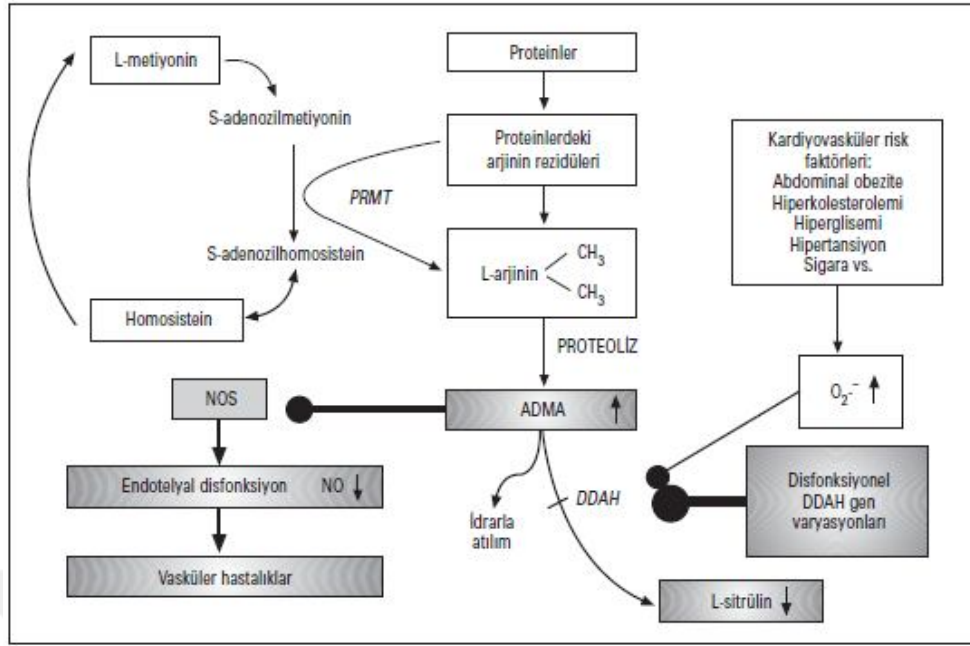
NO, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aracılığı ile L-argininden üretilir ve vasküler tonusu düzenleyerek vasküler homeostazın sürdürülmesinde önemli rol oynar. NO'nun yarılanma ömrü oksidatif stres altında azalmaktadır. NO süperoksit

anyonlarıyla birleşmekte, peroksinitrit meydana gelmekte ve meydana gelen bu ürün lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır. Endotel kökenli NO antiaterosklerotiktir. NO prostasiklinle birlikte trombosit agregasyonunu, immün sistem hücrelerinin adezyonunu inhibe eder ve düz kas çoğalmasını önler. Dolayısıyla NO eksikliği ateroskleroz gelişimini hızlandırır (38).

Endotel fonksiyonun devamında en önemli yolak, NOS aracılığı ile üretilen NO-varlığı olarak düşünüldüğünde bu yolak üzerinde en etkin molekül ADMA'dır (39).

ADMA, damarlardaki dominant NOS izoformu olan eNOS'un inhibisyonunu yaparak hipertansiyonun ve aterosklerozun fizyopatolojisinde önemli olan endotelial disfonksiyona neden olur.

ADMA'nın %10'luk kısmı böbrekler yoluyla uzaklaştırılırken, geriye kalan %90'lık kısım ise dimetil arjinin dimetil aminohidrolaz (DDAH) tarafından metabolize edilmektedir. Bu enzimin aktivitesi detaylı olarak bilinmemekle birlikte, yüksek ADMA düzeylerine katkısı olabileceği düşünülmektedir. Yüksek ADMA seviyelerinin, ileride geçirilebilecek kalp krizinin bağımsız bir belirteci olduğu ve kardiyovasküler nedenlerle gerçekleşen ölüm ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (39).



Şekil 5. ADMA-kardiyovasküler risk faktörleri ilişkisi (39).

3.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Tüm antioksidanlar etkilerini başlıca dört farklı şekilde gerçekleştirmektedir: Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler.

1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastırıcı etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir.

Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve doğal olmayan (eksojen kaynaklı) antioksidanlar olmak üzere iki ana grupta toplanabilir. Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler. Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar: Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır:

- 1) Süperoksit dismutaz (SOD).
- 2) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px).
- 3) Glutasyon S-Transferazlar (GST).
- 4) Katalaz (CAT).
- 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi.
- 6) Hidroperoksidaz.

Enzim olmayan endojen antioksidanlar şunlardır:

- 1) Melatonin.
- 2) Seruloplazmin.
- 3) Transferrin.
- 4) Miyogloblin.
- 5) Hemoglobin.
- 6) Ferritin.
- 7) Bilirubin.
- 8) Glutasyon.
- 9) Sistein.
- 10) Metiyonin.
- 11) Ürat.
- 12) Laktoferrin.
- 13) Albümin (39).

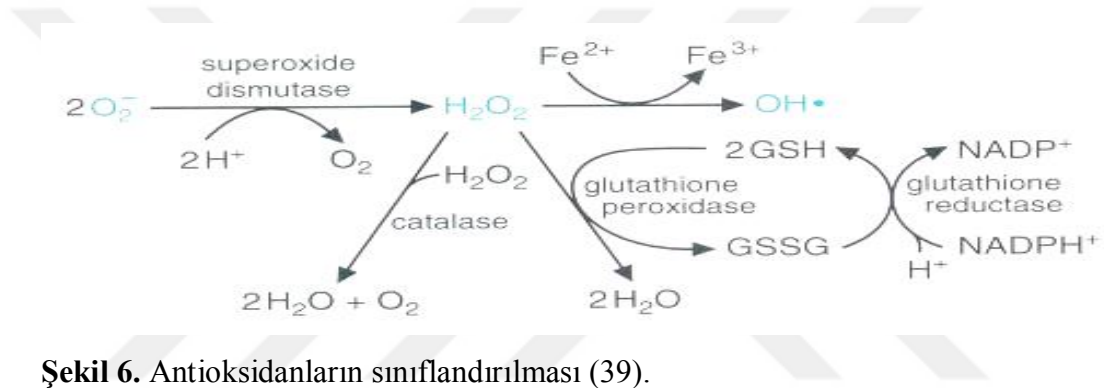
3.4.1. SOD

SOD, süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hücre bölünmelerindeki süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli rol oynar. SOD' un fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO_2 artışıyla artar. SOD'un ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür. İnsan koroner arterlerinden elde edilen örneklerde SOD gibi antioksidan enzim aktivitesinde azalmanın gösterilmiş olması, oksidatif stres ve ateroskleroz ilişkisinin güçlü bir kanıtıdır. Yüksek kolesterol diyeti ile antioksidan enzim olan SOD aktivitesinin azaldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (40).

3.4.2. GSH ve GSSG

Organizmanın bütün hücrelerinde bulunan ve hücrelerin protein yapısı dışındaki sülfidril grubu içeriğinin % 90 kadarını oluşturan GSH, zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli rollere sahiptir. GSH radikal kaynaklı hasara karşı koyarken antioksidan enzimlere substrat olarak görev yapar ve bir radikal tutucusu (scavenger) gibi davranır. Özellikle peroksidaz ve redüktaz enzimlerinin aktiviteleri için son derece önemlidir. GSSG de indirgenmiş GSH'ın yükseltgenmesiyle oluşur. Oksidatif stres sürecinde, GSH düzeyi azalırken, GSSG artar. Bu durumda biriken H_2O_2 organik hidroperoksitler GPx ve GSH-red etkisiyle ortadan kaldırılırlar. GSH, hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini de engeller. Önemli bir indirgeyici güç olan GSH, hücre içi proteinlerin, sistein, dihidrolipoat ve koenzim A gibi moleküllerin tiyol gruplarının, askorbat, α -tokoferol gibi antioksidan

moleküllerin korunmasında, ayrıca DNA'nın deoksiribonüklozid öncüllerinin oluşması için ribonükleotidlerin indirgenmesinde kullanılır. GSH ayrıca hücrelerin oksidatif hasara, toksik bileşiklere, radyasyona karşı korunmasında, bazı ilaçların inaktivasyonunda, östrojen, prostaglandin ve lökotrienler gibi bazı endojen bileşiklerin metabolik işlemlerinde yer alır. Hemoreolojik bir çalışmada eksojen GSH verilmesinin antioksidan etki yanında kan filtrasyonunu iyileştirdiği ve kan viskozitesini azalttığı gösterilmiş ve GSH tedavisinin aterosklerotik hastalarda önemli bir tedavi yöntemi olduğu öne sürülmüştür (41).



Şekil 6. Antioksidanların sınıflandırılması (39).

3.5. Karaciğer Fonksiyon Testleri (ALT, AST, GGT)

Karaciğer fonksiyon testleri, karaciğerdeki yapısal değişiklikleri, biliyer sisteme ilişkin patolojileri bazıları ise karaciğerin sentez kapasitesini göstermekte olup bu yönüyle bir karaciğer hastalığının varlığını, niteliğini ve bir ölçüde de ağırlığını yansıtan testlerdir. Alaninaminotransferaz (ALT, eski deyimle SGPT) ve aspartat aminotransferaz (AST, eski deyimle SGOT) vücutta bir çok organ ve dokuda yaygın olarak bulunan hücre içi enzimlerdir. Yüksek transaminaz değerleri, karaciğeri etkileyen hastalıkların tanısında ve tedavinin takibinde önemli bir göstergedir. Transaminaz seviyesi kronik hepatit, yağlı karaciğer, obezite, ilaçlar, alkol kullanımı, kolelitiazis, hiperglisemi ve hipotiroidizm gibi hastalıklardan

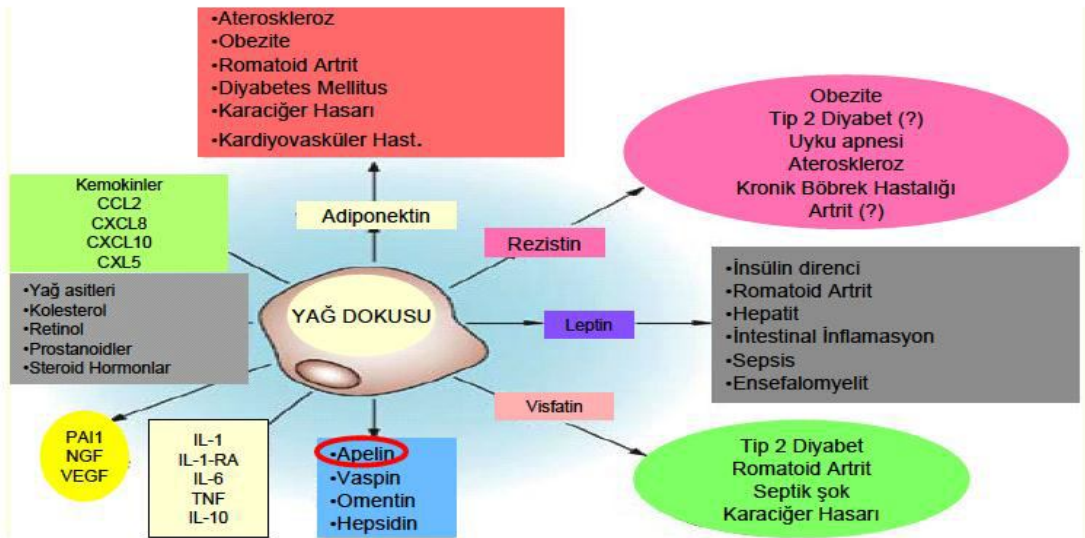
etkilenir. ALT öncelikle karaciğer ve böbreklerde bulunup, kalp ve iskelet kasında daha az miktarda mevcut iken, AST daha çok kalp kası, karaciğer ve iskelet kaslarında bulunur. Karaciğerdeki ALT seviyesi serumdan 3000 kat, AST aktivitesi ise yaklaşık 7000 kat daha fazladır. ALT hücre sitoplazmasında bulunurken AST hem sitoplazmada hem de mitokondiride bulunur.

ALT seviyesi karaciğer hasarını göstermede AST seviyesinden daha spesifiktir (17). Serum ALT aktivitesindeki artışlar çok farklı etkenlere bağlı olabilir. Henry (26) karaciğer hastalığı olan kişilerde serum ALT aktivitelerinin arttığını, diğer durumlarda bu artışın önemsiz olduğunu bildirmiştir. AST hepatoselüler hasarın spesifik bir belirleyicisi değildir. Çünkü diğer dokularda da oldukça fazla miktarda bulunmaktadır. Bu dokularda meydana gelen hücre dejenerasyonlarında AST'nin serumdaki konsantrasyonlarında artışlar meydana gelebileceği bildirilmiştir (17).

Klinik laboratuvarlarda GGT (Gama glutamil transferaz) enziminin aktivitesi serum veya plazmada sensitif fakat çok spesifik olmayan karaciğer fonksiyon testi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (18). GGT birçok hücrenin dış yüzeyinde yer alan ve hücre içi antioksidan koruyucu mekanizmaların bir ögesi olan glutatyonun hücre içine alınmasında aracılık eder. GGT'nin fizyolojik işlevi tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, aminoasit transportuna ve glutatyon ile diğer peptitlerin metabolizmasına katıldığı ve enzimin fizyolojik işlevi ile hücredeki yeri arasında sıkı bir ilişki olduğu belirtilmektedir. Ayrıca bu enzimin hücre savunmasında ve rejenerasyonunda fonksiyonu olabileceği bildirilmiştir. Serum GGT'nin aktivitesi kronik hepatoselüler karaciğer hastalıklarında artar (25). GGT karaciğer ile birlikte safra yollarındaki hasarı gösterir.

3.6. Adipoz Doku

Adipoz (yağ) doku; adiposit, preadiposit ve makrofajları içeren pek çok hücreden oluşmuştur. Aynı zamanda adipoz doku adipokin olarak da bilinen ve metabolik olarak önemli olan çok sayıda proteini sekrete eden aktif bir metabolik dokudur. Adipokinler iştah, enerji dengesi, termogenezis, inflamasyon, insülin direnci/duyarlılığı, anjiyogenez, lipid metabolizması, hücre proliferasyonu ve ateroskleroz benzeri durumlarda rol alan sinyal molekülü grubudur. Bu proteinlerin, bu fonksiyonlarına ek olarak otokrin, parakrin ve endokrin etkileri olduğu da gösterilmiştir. Bunlar; adiponektin, leptin, tümör nekrozis faktor-alfa (TNF-alfa), plazminojen aktivator inhibitör 1, IL6, resistin, asilasyon stimulating protein (ASP), vaspin, visfatin, Aqpaq, IL-1, apelin, retinol bağlayıcı protein 4, serum amiloid A (SAA), Ghrelin, çinko A₂ glikoprotein (ZAG) PAI-1 (plazminojen aktivatör inhibitör), anjiotensinojen, adipsin gibi proinflamatuvar sitokinler/kemokinler ve antiinflamatuvar etkili adipokinlerden oluşmaktadır (42).



Şekil 7. Adipoz dokunun bazı metabolik etkileri, (43)

3.6.1. Ateroskleroz ve Adipoz Doku

Kolesterol birikimi, transkripsiyon faktörlerini etkileyerek adiposit farklılaşmasını ve olgunlaşmasını bozabilir. Hiperkolesteroleminin adiposit hipertrofisi, yağ dokusu iltihabı ve endokrin fonksiyonunun bozulmasına neden olduğu gözlenmiştir. Yağ doku kaynaklı faktörler, damar duvarlarında endotelial hücreler, arterial düz kas hücreleri ve makrofajların fonksiyonlarını etkilemek suretiyle damar duvar homeostazisini etkileyebilirler. Adipokinlerin aynı zamanda aterosklerotik plaklarda da bulunması bu araçların aterosklerotik lezyonlarda endokrin etkilerine ilave olarak lokal etkilerini de düşündürür (44).

Tablo 2. Antiinflamatuvar ve proinflamatuvar adipokinler. (45, 46) .

Antiinflamatuvar adipokinler	Proinflamatuvar adipokinler
Adiponektin	Resistin
İnterlökin 6	İnterlökin 6
Şemerin	Şemerin
Vaspin	Leptin
Visfatin	Visfatin
Omentin	Tümör nekroz faktör-alfa

3.6.2. Vaspin

Vaspin (visseral adipoz tissue-derived serpin) glikoz ve lipid metabolizmasında regülatuar rol oynayan önemli ve yeni bir adipositokindir. Vaspinin serpinlerin bir üyesi olduğu düşünülmektedir. İnsanda, adipoz dokuda ve plasentada eksprese olduğu gözlenmiştir. Vücut yağ dokusunun azalması ve diyabetin kötüleşmesi ile serum vaspin ekspresyonu azalmaktadır. Antiinflamatuvar bir molekül olan vaspinin, inflamasyon ve obezite arasında yeni bir bağlantı oluşturduğu düşünülmektedir. Vaspin, antiinflamasyon görevini, resistin, leptin,

TNF-alfa gibi proinflamatuvar adipokinlerin ekspresyonunu inhibe ederek yapmaktadır. Obez hastalarda adipokinleri de içeren yağ dokusu kaynaklı faktörlerin prematür ve hızlanmış ateroskleroza katılımcı olabileceği ileri sürülmüştür (47).

Vaspin seviyelerinin değişmesi ve böylece fonksiyonel etkileri nedeniyle karaciğer sirozu gibi çeşitli hastalıklara neden olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda dolaşımdaki vaspin seviyelerinin yüksekliği ile hepatosit balonlaşma dejenerasyonu arasında pozitif olarak ilişkili olduğu belirlenmiştir (47).

3.6.3. Visfatin

Visfatin ilk olarak 1994'te insan periferik kan lenfositlerinde DNA çalışmaları sırasında tespit edilmiştir. Fukuhara ve ark. (48) tarafından 2004 yılında izole edilmiştir. Bu adipositokin, insanların visseral adipoz dokusunda yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Visfatinin lenfositlerden eksprese edilen ve daha önce pre B hücre koloni arttırıcı faktör (PBEF) olarak bilinen sitokin ile aynı olduğu bulunmuştur. Visfatin nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan nikotinamidten, nikotinamid mononükleotid (NMN) sentezini sağlayan enzim olan nikotinamid fosforibozil transferaz (Nampt) olarak da bilinmektedir. Visfatin ayrıca adipoz doku dışında kemik iliği, iskelet kasları ve karaciğerde de sentezlenebilmektedir. Visfatin preadipositlerin matür adipositlere dönüşümü sırasında belirgin olarak artar. Adipositlerden trigliserit birikimini ve glikozdan trigliserit yapımını arttırır (49).

Visfatinin inflamasyon ve endotelial hasarın biyo belirleyicisi olduğu, hücre çoğalmasını ve yaşamını, ekstrasellüler matriksi, vasküler reaktivite ve inflamasyonu düzenlemede rolü olduğu ve kardiyovasküler sistemin direkt bir düzenleyicisi olduğu belirtilmektedir. Visfatin, intersellüler adezyon molekül-1 (ICAM-1), vasküler hücre

adezyon molekül-1 (VCAM-1) ve E-selektini içeren adezyon moleküllerinin salınımını tetiklemekte ve lökosit kümeleşmesi ve erken pro-aterosklerotik olaylarda anahtar rol oynamaktadır. Bunun yanısıra visfatinin eNOS inhibitörü L-arjinin analogu, ADMA' yı hidroliz eden bir enzim olan DDAH'yı aktive ettiği de bildirilmiştir (50). Visfatin ile koroner arter hastalığı ve akut myokard infarktüsü olan hastalardaki unstabil aterosklerotik lezyonlar arasında pozitif yönde bir ilişki saptanmıştır. Rüptüre plaktaki zengin lipid içeriği olan yerlerin immünohistokimyasal boyamasında zengin visfatin içeriği gözlenmiştir (51). Damar düz kas hücrelerindeki aterosklerotik plaklarda immünoreaktif visfatin saptanmıştır. Endotel ve damar düz kas hücrelerinde sitokin ve kemokin sekresyonunu artırması, makrofaj ömrünü uzatması, lökosit kümelenmesini sağlaması ve böylece endotel hücre inflamasyonuna ve matriks ayrışmasına sebep olması gibi multipl etkileri doğrultusunda, gerek lokal sentezlenen gerekirse dolaşımda bulunan visfatin, aterosklerotik lezyonların ve plakların hassas hale gelmesini ve rüptüre olmasını arttırabilmektedir (52).

3.7. Melatonin

Melatonin, karanlıkta epifiz bezinden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Melatonin üretimi suprakiazmatik çekirdek (SCN) tarafından kontrol edilir, karanlık başlangıcından 6-8 saat sonra maksimal plazma konsantrasyonu ile pineal salgı zirve yapar. Melatonin karanlığın biyolojik simgesini temsil eder ve açığa çıktığı süre gecenin uzunluğuyla orantılıdır. Işığa maruz kalmak yoğunluğa bağlı bir şekilde salınımını güçlü bir şekilde baskılar (53).

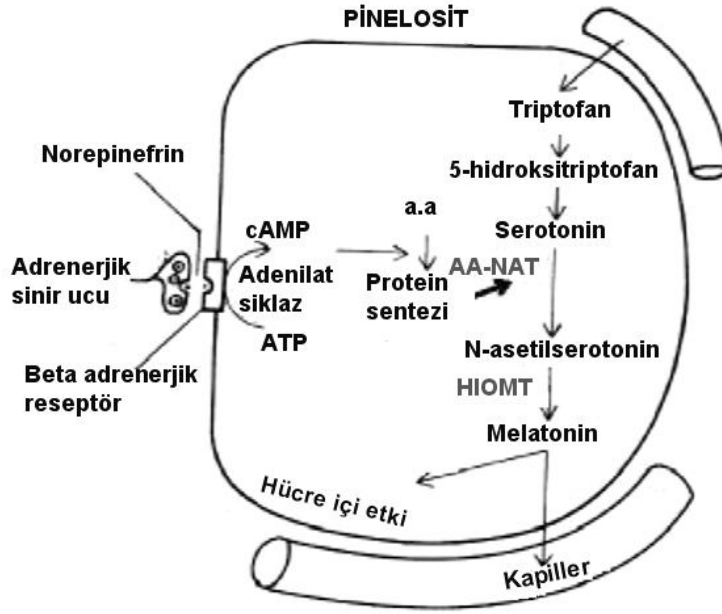
Melatonin pineal beze ek olarak çeşitli organlarda sentezlenir ve tüm morfolojik bariyerleri aşan lipofilik bir moleküldür. Melatonin tükürük, idrar, beyin omurilik sıvısı, ovülasyon öncesi sıvı, sperm sıvısı, amniyotik sıvı, safra ve süt gibi tüm hücrel kompartımanlar dokular ve vücut sıvılarının içinde bulunur. Retina, harder bezi, deri, megakaryositler, gastroenterik mukoza, trombositler, lenfositler, kemik iliği gibi organlarda sayısı, oranı ve miktarı değişebilir (54).

Omurgalılarda melatonin; hipotalamus ve retinada dopamin salımını engeller, büyüme sürecinde ve bazı türlerin ergenlik gelişiminde rol alır, kan basıncını ayarlar, önemli bir serbest radikal süpürücüdür ve immun yanıtı düzenler. Klasik endokrin etkilerine ek olarak parakrin ve otokrin fonksiyonlara da sahiptir ve melatoninin bazı etkileri özel reseptörlerle iletişimi ile dolaylı olarak ilgilidir (54).

3.7.1. Melatonin Sentezi

Epifiz bezinin en önemli salgısı N-asetil-5-metoksitriptamin (melatonin)'dir. Melatoninin biyosentetik yolağı, başlangıç prekürsörü aminoasit ve triptofan olan çok aşamalı bir süreçtir. Kofaktör 6-hidrotetrapterinin (6-BH4) kullanıldığı triptofan hidroksilazın (TPH) katalizlediği 5-hidrokitriptofanın hidroksilasyonu ile süreç başlar. 5-hidroksitriptofan aromatik aminoasit dekarboksilaz tarafından serotonine dönüştürülür (55).

Serotonin arilalkilamin N-asetil transferaz (AANAT) tarafından N-asetilserotonine dönüştürülür. Melatonin sentezinin son aşaması hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) tarafından N-asetilserotonin melatonine dönüştürülmesidir. Başka bir seçenek olarak ise melatonin serotoninin O-metilasyonu aracılığıyla ve sonradan 5-metoksitriptafanın N-asetilasyonu ya da N-asetilasyon ve dekarboksilasyonu izleyen triptofanın O-metilasyonu ile oluşturulabilir (55).



Şekil 8. Pinosit hücrelerindeki melatonin sentezi (55).

AAAD; Aromatik Aminoasit Dekarboksilaz AA-NAT; Aril Alkilamin N-Asatil transferaz HIOMT; Hidroksiindol-O-metiltransferaz (55).

3.7.2. Melatonin Farmakokinetiği

Melatoninin çoğu kanda albümine bağlı olarak taşınır. Albumine bağlı bulunması idrarla atılımını sınırlamasına rağmen, yarılanma ömrü 10-40 dakika gibi nisbeten kısa bir süredir. Karaciğerden ilk geçişte hormonun %90'ı kandan temizlenir. Hepatik hücreler tarafından alınan melatoninin yaklaşık %75'i 6-hidroksimelatonine dönüştürülür. Bu bileşik de, sülfat (%70) ya da glukronik asitle (%6) konjuge olur. Tüm bu metabolitler idrarla atılır. İdrarda 6-sulfatoksimeletonin atılımı serum melatonin konsantrasyonu ile yakın ilişki gösterir (56).

İnsan endojen melatonin üretimi, 100-200 pg /ml doruk plazma düzeyleri ile ilişkili yaklaşık 30 µg/gündür, buna rağmen oldukça değişkendir ve yaşla birlikte azalır. Melatoninin uygulanması ROS ve serbest radikali içeren bir dizi toksik reaktanları nötralize eder. İnsan ya da deney hayvanlarda, gün başına 1-300 mg arasında değişen dozlarda, 3 aydan daha fazla melatonin uygulandığında görünür

toksosite bulunmamıştır. Melatoninin hayvanlarda olduğu kadar insanlarda da suprafizyolojik dozu uygulanması bile toksik etki göstermemiştir (56).

3.7.3. Melatonin Reseptörleri ve Etki Mekanizması

Melatonin çoklu etkileri hem reseptör bağımsız mekanizmaları hem de reseptör aracılığıyla olan süreçleri kapsar. Reseptör aracılığıyla olan etkiler membran proteinlerine çekirdek bağlanma bölgelerine bağlıdır. Membran melatonin reseptörleri kalpte ve anadamarlarda bulunur (57).

MT₁; Mel_{1a} olarak, MT₂; Mel_{1b} olarak bilinir. Her ikisinde 7-transmembran reseptörleri olan G-protein çifti ailesine aittir. MT₁ reseptörleri beyin, kardiyovasküler sistem, immun sistem, testis, yumurtalık, deri, karaciğer, böbrek, adrenal korteks, plasenta, göğüs, retina, pankreas ve dalakta bulunurken, M₂ reseptörleri suprakizmatik çekirdek, immun sistem, deri, testis, kan damarları, retina, hipofiz bezi, böbrek, gastrointestinal sistem, meme bezleri, adipoz doku ve deride bulunmuştur. MT₃ gibi muhtemel melatonin reseptörü, sitozol içinde bulunan zararlı ajanların detoksifikasyonunda fonksiyon gösteren bir enzimdir. Melatonin enzimlerinin en yüksek seviyesi karaciğer ve böbrektedir; kalp ve beyinde ortalama miktarda bulunur (58).

Kardiyovasküler sisteme ilişkin MT₁ ve MT₂ reseptörleri sol ventrikül kardiyomiyositlerinin içinde bulunur. İnsan ventriküler fonksiyondaki melatoninin özel rolü hala açığa kavuşmamıştır (58).

MT₁ aktivasyonu ile olan vazokonstriksiyon ve MT₂ ile olan vazodilatasyona bağlı olarak melatonin damar düzeninde çift etkiye sahip olduğunu in vivo çalışmalar göstermiştir. MT₁ reseptör aracılı mekanizmalar damar inflamasyonuna, sonrasında gelen damar sertliğine ve sempatik sinir uçları aracılığıyla sinyal iletimi modüle olan patojenik süreçlere karşı koruyabilir (58).

Melatonin çekirdek bağlanma bölgeleri geniş bir şekilde dağıtılmıştır. Çekirdek reseptör grupları alt türlerine göre ayrılmışlardır, retinoid yoksun reseptör (ROR_{α}), yüksek seviyede T ve L lenfositlerde, nötrofillerde, monositlerde bulunur. ROR_{β} , beyinde, pineal bezde, retinada ve dalakta bulunur. Melatonin membran ve çekirdek reseptörler aracılığı ile endokrin mediyatörlerinin salgılanması, sirkadiyen multiosklatör sistemi kapsayan direkt veya indirekt geniş çapta etkiler ortaya koyar (Tablo 3) (58).

3.7.4. Melatoninin ve Oksidatif Stres

Melatoninin oksidatif stresi azaltmada önemli etkileri vardır, bunlar; reseptör aracılı olmayan etkisi (direk radikal süpürücü) ve reseptör aracılı olan (hormonal etki) etkisidir. Olası bir melatonin bağlama bölgesi kalsiyum metabolizması ve kalmodulinle yakından ilişkilidir (59).

Melatonin antioksidan ve radikal süpürücü etkisiyle mitokondriyel DNA'yı ve proteinleri ROS indüklü oksidatif hasardan korur; ayrıca lipid peroksidasyonunu azaltarak ve iç mitokondrial membranı da stabilize eder (60).

Melatonin OH^{\cdot} 'ı baskılayabilir ve peroksit radikalın (LOO^{\cdot}) seviyesini azaltabilir. Melatonin ayrıca yüksek toksik peroksit nitrit anyonunu ($ONOO^{\cdot}$) süpürebilir; bu anyon, nitrosative hasara sebep olarak da bilinen nitrik oksit ile süperoksit anyon radikali arasındaki bir reaksiyon ile üretilmiştir. Fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonlarda melatonin; inflamasyonu, oksidatif stresi engeller ya da zayıflatır ve hücre metabolizmasını düzenler. Sadece melatonin değil, onun çeşitli metabolitleri de radikal süpürücüdür (59).

Antioksidanlar oksidatif hasarı farklı bölgelerde ve farklı derecelerde azaltırlar. Bunu yaparken de melatoninin daha etkili olması, hücre içine geniş ölçüde dağılımı ve lipofilikliği ile ilişkili olabilir (59).

Melatonin indirekt olarak hücre oksidatif yüküne karşı GSH-Px, GSH-red, SOD gibi ROS detoksifiyonu yapan hücre üretimini teşvik ederek savaşır. Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki melatoninin, SOD, GSH-Px, GSSG-Rd) ve glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir (61). Önceki çalışmalar, melatoninin, fizyolojik düzeylerinin, oksidatif stres kaynaklı doku hasarına karşı korunmasında önemli olduğunu göstermiştir. Pinealektomi yapılan sıçanlarda karaciğer GSH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur. Melatonin uygulaması GSH düzeylerini anlamlı arttırmıştır. Ayrıca pinealektominin neden olduğu yüksek MDA düzeylerini melatonin uygulaması azaltmıştır (62, 63). Ayrıca I/R hasarına bağlı oksidatif strese karşı melatoninin etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, melatonin MDA değerlerini anlamlı azalttığı ve GSH düzeylerini anlamlı arttırdığı rapor edilmiştir (64, 65).

3.7.5. Melatonin ve Ateroskleroz

Melatoninin kardiyovasküler sistemi etkileyebileceğini son 15 yıl boyunca toplanan kanıtlar göstermiştir. Ancak melatonin bu sistem üzerindeki etkileri hala kesin olarak kanıtlanmamıştır. Diğer organlara benzer olarak kardiyovasküler sistem, kan basıncı, kardiyak output, kalp atış hızını kapsayan mevsimsel ve günlük ritimler gösterir (40).

Eksojen melatonin uygulamasının kardiyovasküler sistemde faydalı etkileri vardır. Yapılan çalışmalar, melatonin hipokolesterolemik etkiye sahip ve bu etkiyi

safla asitlerinin içine endojen kolesterol temizleme mekanizmasının geliştirilmesi ile olduğunu; LDL birikimini ve kolesterol sentezini inhibe ettiğini ve LDL'yi oksidasyondan koruduğunu rapor etmişlerdir. Uzun sfireli melatonin uygulamasının sıçan plazmasında yağlı asit bileşimini modifiye ettiği ve kolesterol beslenmesinin neden olduğu endotel tabakası içine yağlı asit sızıntısının dfilettiğini gstermişlerdir (66).

Melatonin, LDL'nin sulu mikroçevresinin arasında sfirekli değişim gsteren konjuge dienlerin kinetiğini ve LDL' nin dış fosfolipidin tek katlı tabakasının içine birleşimini azaltır. Melatoninin lipid fazı gibi sulu bir ortam içinde peroksit radikallerini sypurmesi ve oksidasyon zincirini kırması ile amfifilik antioksidan olarak rol oynadığı gsterilmiştir. Bunun yanında, LDL reseptorlerinin sentezinin/aktivitesinin artışı, kolesterol sentezinin inhibisyonu, safla asitleri veya beyaz adipoz dokunun birkaç alt tipi tarafından yağ asitlerinin inhibisyonu ile kolesterol katabolizmasının arttırılması da dahil olmak fire melatoninin ateroprotektif etkileri vardır (66).

Melatonin farklı aterosklerotik patolojik sinyal proseslerinde rol olarak ateroprotektif etkiler sergiler; endotel kaynaklı adezyon molekul oluşumunu engeller, endotelyal tabaka içine yağlı asit sızıntısını azaltır, serbest radikalleri nfirealize eder, lipid peroksidasyonunu azaltır, kolesterol kleransını module eder ve mitokondriyal solunum zincirinden elektron kaçağını onler. Lipofilik ve non-iyonize doğasından dolayı LDL parçacıklarının sıvı fazına girer ve lipid yıkımını engeller ve ayrıca endojen kolesterol kleransını arttırabilir (67).

Melatonin uygulaması, genç Zucker diyabetik obez sıçanların HDL kolesterol seviyesindeki artma, yağ infiltrasyonu ve trigliserit seviyesindeki azalma ile lipid profilini değiştirmiştir (66).

Mitokondriyal seviyede melatonin etkilerine en az üç mekanizma aracılık edilebilir. Birincisi indolaminin antioksidan ve radikal süpürücü özellikleri ile organelleri oksidatif hasardan korur. İkincisi melatonin mitokondriyal DNA kimliğini korur. Üçüncü olarak, melatonin mitokondriyal gözenek ve seçici olmayan voltaja bağımlı mitokondriyal kanal ile doğrudan etkileşmektedir. Böylece, melatonin uygulaması aterosklerotik patojenik sürecin mitokondriyal aracılı apoptoz özelliğinin yanı sıra oksidatif stres kaynaklı mitokondriyal işlev bozukluklarıyla çeşitli mücadele için geçerli bir tedavi stratejisini temsil edebilir (60).

3.8. Statinler

3.8.1. Statinler ve Ateroskleroz

Statinler aterosklerozun ilerlemesini engelleyici, plazma kolesterol düşürücü ilaç olarak yaygın bir şekilde kullanılır. Statinlerin kardiyovasküler morbidite ve mortaliteyi azalttığı gözlenmiştir. Genellikle bu etkileri lipid düşürücü etkilerine bağlansa da yapılmış olan bu çalışmaların subanalizlerinde lipid düşürücü etkilerinden bağımsız olan direkt kardiyoprotektif etkileri de gözlenmektedir. Tüm statin moleküllerinin ortak noktası sahip oldukları HMG benzeri yapıya sahip olan dihidroksiheptenoik asid zinciridir. Bu zincir HMG-CoA redüktaz enzimi için yalancı bir substrat oluşturarak enzimin aktif bölgesine bağlanır ve kompetitif bir inhibisyona neden olur (68).

HMG-CoA redüktaz enzimi, HMG-CoA'nın mevalonata çevrildiği ve de novokolesterol sentezinin hız kısıtlayıcı basamağını olan reaksiyonu katalizler. Bu

enzimin statinler tarafından yarışmalı inhibisyonu hepatositlerde kolesterol sentezini baskılar. Hücre içindeki kolesterol miktarının azalması hepatosit yüzeyinde LDL reseptörü ekspresyonunu artırır. Sonuçta dolaşımdan daha fazla LDL kolesterol çekilir ve dolaşımdaki LDL konsantrasyonu azalır. Statinler ayrıca HDL kolesterolü artırırken, 250 mg/dl'nin üzerindeki TG seviyeleri çoğunlukla düşürülür ve düşme oranı LDL kolesterolde sağlanan düşme yüzdesine benzerdir (68).

Plağın içerdiği kolesterol esterlerinin miktarı, plak stabilitesini etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Statinler, LDL'yi azaltarak plak içine giren LDL miktarının azalmasına sebep olurlar. Statinlerin, özellikle plağın kolesterol esterlerinin azalmasında ve birikiminin önlenmesinde etkili oldukları gözlenmiştir. LDL oksidasyonunun inhibe olması da endotel içine kolesterol girişini inhibe etmekte, bu da plağın kollajen sentezini ve içeriğini arttırmakta ve stabil hale gelmesini sağlamaktadır. Kolesterol esterlerinin kolesterol kristallerine dönüşümünü hızlandırarak plağın daha kararlı ve rüptüre dayanıklı hale gelmesine katkıda bulunur. Statinler, aterosklerotik lezyon etrafında oluşan inflamatuvar ve diğer metabolik olaylarda önemli değişiklikler meydana getirir. Böylece lipid düşüşü ile lezyon büyüklüğünde değişikliklerden bağımsız olarak, aterosklerotik plak kalitatif olarak değişerek klinik olaylar engellenebilir (69).

Statin tedavisi ile intrasellüler kolesterol sentezinin azalmasına ek olarak, kolesterol sentez yolundaki ara ürünlerinden oluşan izoprenoidlerin düzeyleri de düşer. Yani statinlerin lipid düşürücü etkilerinden başka, izoprenoidlerin azalmasıyla ortaya çıkan pleiotropik etkileri de vardır; endotel fonksiyonu düzeltmek, aterosklerotik plak stabilizasyonu sağlamak, antiinflamatuvar, immunomodülatör ve antitrombotik etkiler, kemik metabolizmasındaki olumlu etkileri, demans riskini azaltmak, apoptozun

indüksiyonu ve antiproliferatif etkiler gibi pleotropik etkilere de sahip olduğunu gösterilmiştir (69).

3.8.2. Statinler ve Oksidatif Stres

Statinlerin kolesterol bağımsız ya da pleiotropik etkilerinin çoğu iyileştirici ve geliştirici olarak ortaya çıkar. Endotelial fonksiyonun düzeltilmesi, aterosklerotik plağın stabilitesinin artması, oksidatif stresin azalması ve vasküler inflamasyonun azalmasına katkıda bulunurlar. Statinler ayrıca koagulatif ve fibrinolitik süreçlerde yararlı rol oynarlar. Doku tipi plazminojen aktivator ekspresyonunu artırarak NO biyoyararlanımını artırır ve endotel disfonksiyonunu düzeltirler (70). Anabilim dalımızda yapılan bir çalışmada, NOS inhibisyonu ve tuz ile oluşturulan hipertansiyonda, rosuvastatinin oksidatif stres ile ilişkili ADMA seviyesini amlodipine benzer şekilde etkileyebileceği görülmüştür (71).

Statinler, endotel-kaynaklı gevşemeleri süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi ROS oluşumunu inhibe ederek artırır. Bununla birlikte, lipid düşürücü etkileriyle vasküler oksidatif stresi azaltmaktadırlar. Statin tedavisi ile lokal inflamatuvar olaylar inhibe olmakta, plak rüptüründen sonra trombotik risk azalmaktadır. Statinler ile monosit adezyon molekül ekspresyonunun ve lökositlerin damar duvarına adezyonu ile düz kas hücre proliferasyonunun azaldığı gözlenmiştir (70). Statinler NOS aktivitesini artırarak NO seviyelerinde artışa neden olabilir. vazomotor tonusu düşürerek endotel disfonksiyonunun iyileşmesine, NO'nun antiagregan özelliği sayesinde de tromboz gelişiminin engellenmesine katkıda bulunur (70).

3.8.3. Atorvastatin

Lipofilik özellikte HMG-CoA redüktaz inhibitörlerinden birisidir. Oral olarak alındığında oldukça hızlı bir şekilde absorbe edilir ve 1-2 saat içerisinde maksimum

plazma konsantrasyonuna ulaşır. Plazma proteinlerine %98 oranında bağlanır. Sentetik bir statin olup lipofilik özelliktedir. Karaciğerde ilk geçiş eliminasyonuna uğrayarak biyotransformasyona uğrar. Sitokrom P450 enzim sistemiyle beta oksidasyon ürünlerine ve orto-parahidroksilat türevlerine dönüşür. Bazı metabolitleri farmakolojik olarak aktiftir. Enterohepatik sıklusa katılmasına rağmen klinik yönden sakınca oluşturmaz. Esas olarak safra yoluyla atılır, fakat %2 oranında üriner atılım söz konusudur. Biyolojik yarılanma ömrü 15 saat kadardır (72).

Molekül olarak bazı farmokokinetik özellikleri nedeniyle diğer statinlere göre farklılıkları mevcuttur. Ön ilaç olan atorvastatinin büyük kısmı ortho- ve para-hidroksil türevlerine ve çeşitli P-oksidasyon ürünlerine metabolize olur. Ortho- ve para-hidroksil türevlerinin %70'i HMG-CoA redüktazı inhibe eder. Bu türevler LDL oksidasyonunun azalmasına da yardımcı olur (72). Rosuvastatin hariç en uzun yarılanma ömrü olan statindir ve yarılanma ömrü yaklaşık 14 saattir. Ancak aktif metabolitleri sayesinde bu süre 20-30 saate çıkabilmektedir.

3.9. Çalışmanın Amacı

Lipid parametreleri, aterosklerotik indeks ve karaciğer fonksiyon testlerinin, lipid peroksidasyon ürünü MDA, antioksidan GSH düzeylerinin, SOD aktivitesinin, NOS inhibitörü ADMA'nın, antiaterosklerotik vaspin ve proinflamatuar visfatin düzeylerinin, hiperkolesterolemide önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Melatoninin hiperkolesterolemide antioksidan parametreler, lipid profili üzerine etkisiyle ilgili çalışmalar yapılmıştır. Ancak bizim bilgilerimize göre vaspin, visfatin, ADMA, GSH düzeylerine, SOD aktivitesine; aterosklerotik indeks, karaciğer fonksiyon testlerine, Phe-ACh yanıtlarını içeren damar duyarlılıklarına etkisi henüz bilinmemektedir.

Bu çalışmada, hiperkolesterolemide profilaktik olarak kolesterol ile eş zamanlı ve tedavi amaçlı son 2 hafta uygulanan melatoninin;

- Lipid parametrelerine, aterojenik indekse, karaciğer fonksiyon testlerine,
- Lipid peroksidasyon ürünü MDA' ya ve antioksidan GSH seviyesi ve SOD aktivitesine,
- Oksidatif stres varlığında arttığı bilinen, eNOS inhibitörü ADMA seviyesine,
- Antiaterosklerotik vaspin, proinflamatuvar visfatin düzeylerine,
- Vasküler kasılma-gevşeme cevaplarına,
- Karaciğer, böbrek ve aort dokularında histopatolojik değişimlere etkisinin araştırılması amaçlandı.

Ayrıca, melatonin bu parametreler üzerine etkisi; hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan HMG-CoA redüktaz inhibitörü atorvastatin ile karşılaştırıldı.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Deney Hayvanları

Çalışmada, 300±50 gram ağırlığında Spraque-Dawley cinsi 35 erkek sıçan kullanıldı. Deney öncesi ve deney sırasında tüm hayvanlar 12 saat ışık, 12 saat karanlık foto periyodunda ve 22-24 C° sabit ısıdaki odalarda barındırıldı. Çalışma için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan gerekli onay ve izin alındı (Toplantı tarihi: 08.01.2014, Toplantı sayısı: 2014/01, Karar No: 10).

4.2. Deney Planı

Sıçanlar her grupta 7 hayvan olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Melatonin ve atorvastatin tedavi süresi boyunca etanol içinde çözülerek günlük stok solüsyon hazırlandı. Stok çözeltiler melatonin uygulaması öncesi (%0,9) NaCl izotonik solüsyonu ile sulandırıldı. İlaç solüsyonları hergün taze olarak hazırlandı ve enjeksiyonlar düzenli olarak her gün aynı saatte yapıldı.

Tablo 3. Deney grupları

Grup I (Kontrol, n=7): 8 hafta boyunca normal su ve pellet yem verildi. İzotonik (% 0,9) NaCl solüsyonu (0,5 cc/gün) intraperitoneal i.p. uygulandı.
Grup II (HCT, n=7): % 2 Kolesterol + %0.5'lik kolik asiti içeren yem 8 hafta verildi. İzotonik (% 0,9) NaCl solüsyonu (0,5cc/gün) i.p. uygulandı.
Grup III (HCT+ MEL, n=7): % 2 Kolesterol + % 0.5'lik kolik asit diyeti ile birlikte melatonin (5 mg/kg/gün) i.p. olarak saf etanolla çözülerek izotonik içinde uygulandı.
Grup IV (HCT+2MEL, n=7): Hiperkolesterolemi oluşturulmuş sıçanlara deneyin son 2 haftasında melatonin (10 mg/kg/gün) i.p olarak saf etanolla çözülerek izotonik içinde uygulandı.
Grup V (HCT+ATOR, n=7): Hiperkolesterolemi oluşturulmuş sıçanlara son 2 hafta atorvastatin (10 mg/kg/gün) saf etanolla çözülerek izotonik içinde gavajla uygulandı.

Çalışmamızda kullanılan melatonin dozu miktarları (73-75)'na göre belirlenmiştir.

4.3. Deney Hayvanlarının Beslenmesi

Sıçanların beslenmesinde Elazığ Yem Fabrikası'ndan temin edilen 8 mm'lik rat pellet yemleri kullanıldı, taze su ve yem *ad libitum* olarak verildi. Sıçanların beslenmesinde kullanılan yemin bileşimi Tablo 2.1.'de gösterilmiştir. Hiperkolesterolemik yem, standart yeme % 2 kolesterol + % 0,5 kolik asit katılarak 10 kg'lık paketler halinde manuel olarak ve taze hazırlandı. Yemin hazırlanışında kullanılan kolesterol ve kolik asidin miktarları (73,76) göre belirlendi. Hazırlanan yemler kullanım süresince +4 °C'de saklandı. Sıçanlar 8 hafta boyunca % 2 kolesterol ve % 0.5 kolik asitli yemle beslenerek hiperkolesterolemi oluşturuldu.

Tablo 4. Yem bileşimi

Yem Bileşimi	Oran
Su (en çok)	% 12
Ham protein (en az)	% 24
Ham selüloz (en çok)	% 7
Ham kül (en çok)	% 8
HCL' de çözünmeyen kül (en çok)	% 2
NaCl (en çok)	% 1
Mineral Karması *	% 1.25
Vitamin Karması **	% 1.25
Metabolik enerji	2650 kcal/kg

* Mineral Karması: Kalsiyum (% 1.0 -2.8), Fosfor (% 0.9), Sodyum (% 0.5-0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg).

** Vitamin Karması: Vitamin A (300 iü/kg), Vitamin D₃ (1000 iü/kg), Vitamin E (60 mg/kg), Vitamin B2 (4 mg/kg).

4.4. Cerrahi uygulamalar

Sekiz hafta süreyle uygulama yapılan sıçanlarda kan kolesterol düzeyleri ölçülerek 130 mg/dL' nin üzerinde olduğu tespit edildi ve eter anestezine alınarak dekapite edildi. Yeterli kan örnekleri alındı. Dekapite edilen sıçanların aortlarını almak için, hızlıca abdomen ve toraks orta hattan açıldı. Torasik aorta diafragmanın

üzerinden başlayarak arkus aortaya doğru diseke edilerek çıkarıldı ve soğuk krebs solüsyonu içine alındı. Torasik aorta çevre bağ ve destek dokularından dikkatlice temizlenerek arkusa yakın uçtan 4 mm boyunda halka halinde kesildi. Ayrıca laparotomi yapılarak karaciğer, böbrek ve kalp dokuları alındı. Bir kısmı ise %10'luk formaldehit içerisinde konularak, histopatolojik analizler için ayrıldı.

4.5. İn vitro deneyler

Hazırlanan 4 mm boyundaki torasik aorta halkaları, lümeninden birbirine paralel iki paslanmaz çengel geçirilerek içerisinde 37°C'ta ısıtılmış ve %95 O₂ + %5 CO₂ karışımı ile gazlandırılan Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu bulunan 10 ml'lik izole organ banyosuna asıldı. Alt çengel izole organ banyosunun tutma kısmına tutturulacak üst çengel de izometrik kasılma cevaplarını kaydetmek için force-displacement transducerlerine (FT 0.03) bağlandı. Kayıtlar BIOPAC marka (Model MP36) multirecorder ile yapıldı. İzole organ banyosuna asılan torasik aorta halkaları 2 gramlık istirahat gerimi altında 1 saat boyunca dengelendi. İzole organ banyosundaki Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu metabolik son ürünlerin birikimini önlemek için her 15 dakikada bir taze solüsyonla yenilendi. İn vitro torasik aorta çalışmaları endotel varlığında çalışıldı.

4.5.1. Fenilefrin kasılma cevapları

Aortik halkalarda artan konsantrasyonda fenilefrin (10⁻⁹-10⁻⁴ mol/L) kümülatif verildi ve her dozda kasılma platoları net bir şekilde görülmeden diğer doza geçilmedi.

4.5.2. Asetilkolin gevşeme cevapları

Artan dozlarda fenilefrin uygulamasıyla elde edilen eğriden submaximal doz belirlendi. Sonrasında submax fenilefrin dozu ile kasılma yapıldıktan sonra asetilkolin artan konsantrasyonda (10^{-9} - 10^{-4} mol/L) kümülatif olarak verildi. E_{max} değerleri için 80 mmol/L KCI ile elde edilen kasılma cevabı referans alınarak % kasılma cevabı olarak ifade edildi.

4.6. Biyokimyasal analizler

Alınan kan örnekleri 1.5 ml'lik ependorf tüplere konuldu, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edilerek serumları alındı. Serum ADMA seviyeleri, lipid parametreleri (LDL, HDL, TK, TG) ve karaciğer fonksiyon testlerinin (ALT, AST, GGT) ölçümü için; alınan kalp, karaciğer, böbrek doku örnekleri oksidatif parametrelerin (MDA, GSH, SOD) ölçümü için -80°C de derin dondurucuda saklandı. Bir kısmı ise %10'luk formaldehit içerisine konularak, histopatolojik analizler için ayrıldı.

4.6.1 Homojenatların Hazırlanması

Derin dondurucudan alınan dokular tartılıp cam tüplere konuldu. Üzerlerine 1/10 (g/v) oranında dilüsyon olacak şekilde %1,15'lik potasyum klorür (KCI) ilave edildikten sonra soğuklukları muhafaza edilerek cam-teflon homojenizatörde 16.000 devir/dakika hızda 3 dakika homojenize edildi. Geri kalan homojenat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 45 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Bir miktar süpernatant SOD enzim aktivitesi için ayrıldı. SOD ölçümü için ayrılan süpernatantlar 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5) karışımı ile vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra tekrar soğutmalı santrifüjle 45 dakika 3500 rpm'de santrifüj edildi. Üstte oluşan faz kullanılarak SOD enzim aktivitesi ve protein ölçümü yapıldı.

4.6.2. Doku MDA Düzeylerinin Ölçümü

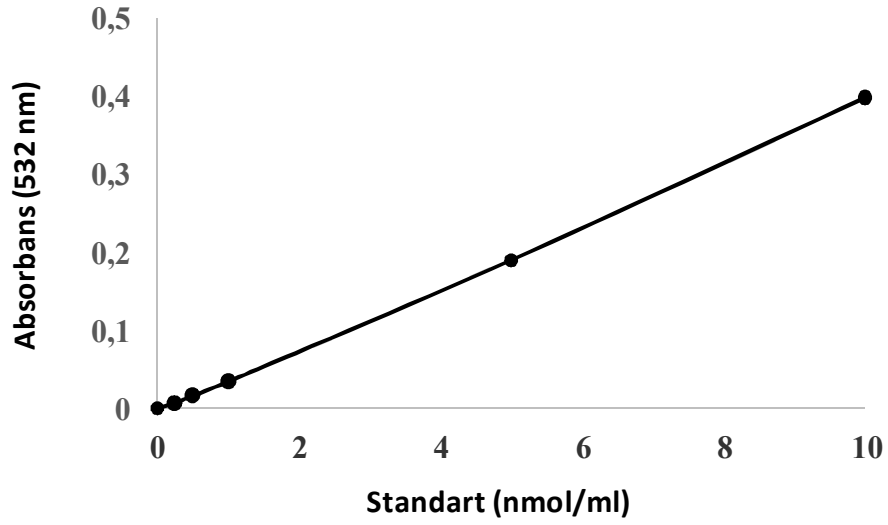
Hazırlanan homojenatlarda doku MDA tayinleri yapıldı. Doku MDA düzeylerinin tayini spektrofotometrik olarak Ohkawa ve ark. (74) tarafından önerilen metoda göre yapıldı.

Aerobik şartlar altında ve pH 3.5'te, doku homojenatının kaynar su banyosunda bir saat inkübasyonu sonucu, lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır.

Ayırıcılar

- 1- Tiyobarbitürik asit (TBA) ayırıcı: 0.25 N HCl içerisinde %0,65 TBA çözdürüldü.
- 2- Trikloroasetik asit (TCA) ayırıcı: 0.25 N HCl içerisinde %10 TCA çözdürüldü.
- 3- Standart (1,1,3,3 tetraetoksipropan): %50 Etanol içerisinde hazırlandı.

Stok standarttan konsantrasyonu 20 nmol/ml olan günlük stok hazırlandı. Bu standarttan belli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 0.25, 0.5, 1, 5, 10 nmol/ml konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Çalışma standartlarından 0,5 ml TCA ve TBA ayırıcılarından 1'er ml alınarak kalibrasyon eğrisi hazırlandı (Şekil 9).



Şekil 9. MDA standart eğri grafiği

Tüpler karıştırıldıktan sonra 95 °C’de 30 dk kaynar su banyosunda tutuldu ve soğutuldu. 3500 rpm’de 10 dk santrifüj edilip üst kısımları pipetlendi. 532 nm’de köre karşı okunup standartlardan eğri çizimi yapıldı. Daha sonra çalışılan tüm örnekler için bu eğri kullanılarak MDA düzeyleri belirlendi. Ölçülen doku MDA düzeyleri nmol/ml olarak ifade edildi.

Örnekler için ayıraçlar tüplere standart eğri oluşturulurken uygulanan şekilde (0,5 ml homojenat, 1 ml TBA, 1 ml TCA) hazırlandı ve aynı uygulamalara tabi tutuldu. Spektrofotometrede 532 nm’de absorbanslar belirlendi ve kalibrasyon eğrisi yardımıyla MDA düzeyleri nmol/ml homojenat olarak hesaplandı. 532 nm’de okunan örnek absorbansları (OD) standart değerleri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi.

$$MDA (nmol/ml) = (\text{Örnek absorbansı} / \text{Std. absorbansı}) \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

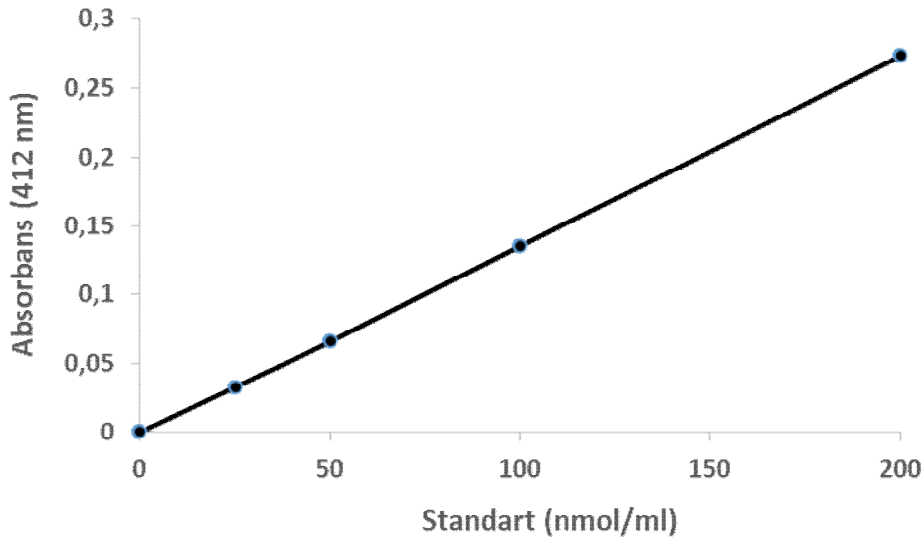
4.6.3. Doku GSH Düzeylerinin Ölçümü

Dokulardaki redükte GSH düzeyleri Ellman tarafından önerilen ditiyonitrobenzoik asit geri çevirim metodu olarak tanımlanan yöntemle göre tayin edildi. 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit (DTNB), sülfüdril bileşikler tarafından redükte edilerek bir disülfid bileşiği olan sarı renkli kompleks oluşturulur. Daha sonra bu sarı renkli bileşiğin optik dansitesi 412 nm dalga boyunda ölçülerek GSH düzeyleri saptanır.

Ayırıcılar

1. Tris EDTA Tamponu (0,2 mol/ml, pH: 8,9)
2. TCA Ayırıcı (% 10'luk)
3. DTNB (5-5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit) (0,01 mol/L)

Konsantrasyonu 1000 nmol/ml olan stok standart hazırlandı. Bu stok standarttan belli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 25, 50, 100, 200 nmol konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10. GSH standart eğri grafiği

Homojenat +4 °C'de 45 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. 0.5 ml süpernatant ile 0.5 ml TCA ile çöktürüldü ve tekrar 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstteki kısımdan 0.5 ml alınıp 2 ml Tris EDTA tamponu ilave edildi. Daha sonra 0,1 ml DTNB ilave edilerek karıştırıldı. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 412 nm'deki absorbansları köre karşı okunarak belirlendi. Elde edilen değerler $\mu\text{mol/mg}$ protein olarak sunuldu.

4.6.4. Doku SOD Aktivitesi Ölçümü

SOD oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Doku SOD enzim aktivitesi metoduna göre ölçüldü.

Bu yöntemde SOD aktivitesi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksidin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan süperoksit radikallerinin NBT'yi indirgemesi sonucu oluşan renkli formazon spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamlarda indirgenme meydana gelerek mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD bulunduğunda ise mavi-mor renk oluşmaz ve enzim aktivitesine bağlı olarak daha açık bir renk oluşur.

Ayırıcılar

1. Assay reaktifi: 200 ml 0.3 mM ksantin, 100 ml 150 μM NBT, 100 ml 0,6 mM Na_2EDTA , 30 ML 1 g/L bovin serum albümin (BSA), 60 ml 400 mmol/L Na_2CO_3 . Tüm çözeltiler karıştırılarak son hacim 490 ml olacak şekilde assay reaktifi hazırlanır.
2. Ksantin oksidaz (167 U/L)
3. CuCl_2 (0.8 mM)

SOD ölçümü için ayrılan süpernatantlar 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5) karışımı ile vorteks yardımıyla karıştırılıp tekrar soğutmalı santrifüjle 45 dakika 3500 rpm'de santrifüj edildikten sonra üstte oluşan faz kullanılarak SOD enzim aktivitesi ölçülür.

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Assay reaktifi	2.85	2.85
Örnek	-	0.1
Distile su	0.1	-
Ksantin oksidaz	0.05	0.05

Tüpler vortekslenip 20 dakika oda sıcaklığına inkübe edildikten sonra kör ve örnek tüplerine 1'er ml CuCl₂ eklenerek reaksiyon durduruldu. Spektrofotometrede 560 nm'de assay reaktifi ile sıfırlanarak kör ve örnek tüplerinin absorbanları okundu.

$$\text{Enzimin \% inhibisyonu} = \frac{[\text{Absorbans}_{\text{Kör}} (K) - \text{Absorbans}_{\text{Örnek}} (\text{Ö})]}{K} \times 100$$

Bir SOD ünitesi; NBT redüksiyonunu % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların rölatif yoğunlukları Image Analyses System (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA) yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

4.6.5. Lipid Parametreleri ve Karaciğer Fonksiyon Testlerinin Ölçümü

Serumda TK, HDL Kolesterol, LDL Kolesterol ve TG düzeyleri ile AST, ALT, GGT ve total bilirubin düzeyleri Fırat Üniversitesi Hastanesinde Siemens Advia 2400 (Siemens Healthcare Diagnostics Tarrytown, USA) otoanalizöründe Siemens marka ticari kitler kullanılarak ölçüldü. VLDL Kolesterol düzeyleri ise hesaplama ile elde edildi.

4.6.6. Aterojenik İndeks

Aterojenik İndex = [serum kolesterol düzeyi – serum HDL düzeyi]/serum HDL düzeyi formülüyle Gill ve ark. (73) kullandığı yöntemle hesaplandı

4.6.7. Serum ADMA ölçümleri

Serum ADMA düzeyleri HPLC yöntemiyle ölçüldü. Deneklerden elde edilen serum örneklerinden ADMA kiti ile ticari firmaca (Eurika Lab Division ,Code Z58010) belirlenen protokol uyarınca ölçüm yapıldı.

4.7. Doku Vaspin-Visfatin Ölçümü

Western blot prosedürü; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, nitroselüloz membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla gösterilmesidir. Bunlar; jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son aşamada ise proteinlerin görüntülenme aşamalarıdır. Western blot analizi Primer antikor olarak vaspin antibody (I-14) 200 ug/ml Sc-79815, anti-visfatin (EPR3392) antibody 100ug AB109210 Abcam antikorları kullanıldı. Primer antikorlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanarak kullanıldı. Nitroselüloz membranlar, vaspin antibody (I-14) 200 ug/ml Sc-79815, anti-visfatin (EPR3392) antibody 100ug AB109210 Abcam antikorları ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünoglobulinle 37°C'de

90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solusyonuyla yıkandı.

Bantların görüntülenmesi: Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03–0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solusyonu kullanıldı. DAB’la reaksiyon sonucu nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5–10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB’la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif

4.8. Histopatolojik Metot

Histopatolojik muayeneler için aort, karaciğer ve böbreklerden alınan doku örnekleri, % 10’luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Bilinen klasik işlemlerden geçirildikten sonra, dokulardan parafin blokları hazırlandı. Bloklar 5 µm kalınlığında kesilerek hematoxylin-eosin (HE) yöntemine göre boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

Karaciğer, böbrek ve aort dokularında tespit edilen değişimler lezyon yok (0), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) lezyon şeklinde skorlandı. Skorlama sonuçları istatistiksel açıdan değerlendirildi.

4.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen tüm veriler ‘SPSS for Windows 21.0’ paket programına göre istatistiksel olarak yorumlanıp değerlendirildi. Tanımlayıcı veriler ortalama ± standart sapma (SS) olarak belirtildi. Gruplar arası farklılığın tespiti için tek yönlü ANOVA analizi ve Post Hoc Tukey testi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.10. Kullanılan Kimyasallar

Hiperkolesterolemik yem yapımında kullanılan kolesterol Ambresco (Solon, USA) firmasından, kolik asit ise Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany) firmasından, Fenilefrin, Asetilkolin, Melatonin Sigma Aldrich Inc. St. Louis, MO. A.B.D' dan satın alındı. Atorvastatin ATOR adlı ilaçtan temin edildi.



5. BULGULAR

5.1. Canlı Ağırlık Değişimleri

Araştırmada kullanılan sıçanlara ait başlangıç ve bitiş canlı ağırlık değişimleri Tablo 5'te gösterilmiştir. Sıçanların başlangıç ağırlıkları homojen olarak oluşturulmuş ve ortalama 300 ± 50 g aralığında olan hayvanlar kullanıldı. Kontrol, hiperkolesterolemi ve son 2 hafta melatonin uygulanan gruplarda başlangıç ağırlıkları ile deneyin sonunda ölçülen ağırlıklar arasında istatistikî olarak bir artış ($p<0,05$) olmasına karşılık eş zamanlı melatonin ve atorvastatin uygulanan gruplarda ise deneye başlanan ağırlıklarla deneyin sonu ağırlıkları arasında fark olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca çalışma periyodu boyunca ölen hayvan olmadı.

Tablo 5. Sıçanların canlı ağırlıkları.

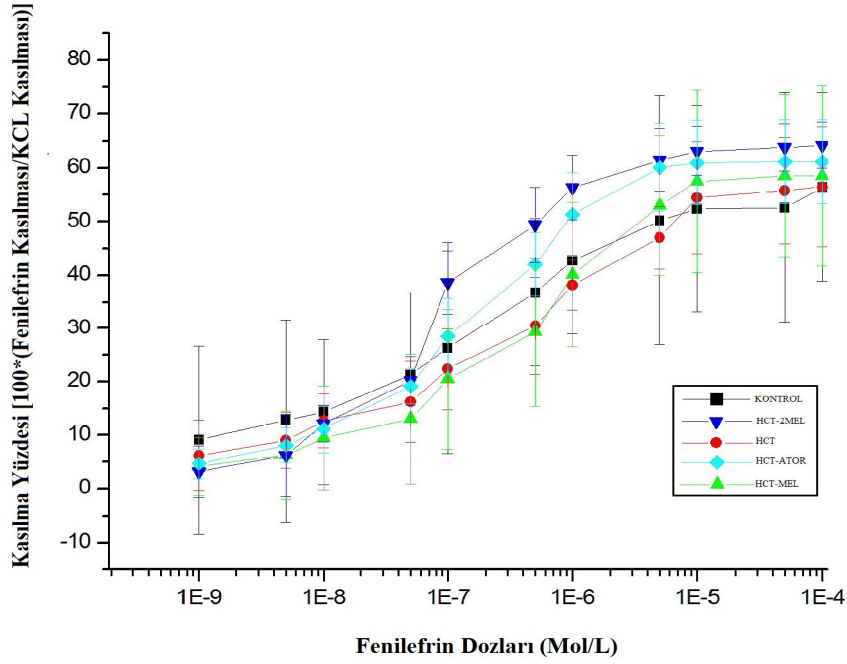
Gruplar	Başlangıç canlı ağırlığı (g)	Bitiş canlı ağırlığı (g)	P değeri
KONTROL	302,91±32,33	362,18±34,04	0,000
HCT	323,70±36,97	386 ±43,81	0,003
HCT-MEL	308,57±20,61	338,86±36,20	0,078
HCT-2MEL	312,43±29,68	377,86±55,30	0,017
HCT-ATOR	302±37,11	345±66,19	0,160

Veriler Ort \pm SS olarak ifade edilmiştir.

5.2. Torasik aortada kasılma-gevşeme cevapları

5.2.1. Fenilefrin kasılma cevapları

Artan konsantrasyonlarda fenilefrin uygulamasına karşı elde edilen torasik aorta kasılma yanıtları ve E_{max} ve EC_{50} değerleri arasındaki fark anlamlı değildi. (Şekil 11, Tablo 6).



Şekil 11. Fenilefrin doz cevap eğrisi

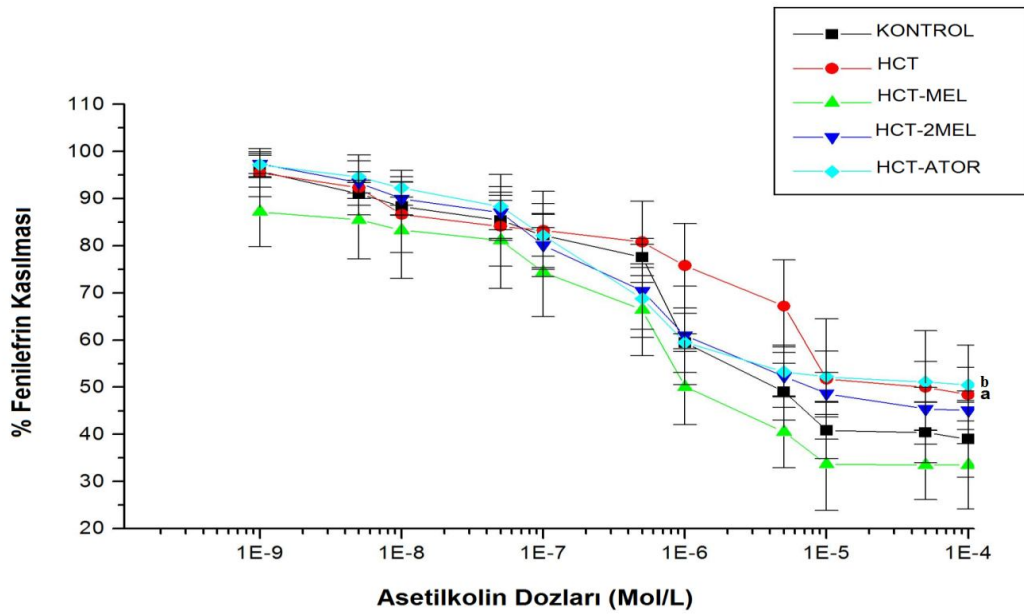
Tablo 6. Fenilefrin kasılma cevapları E_{max} ve EC_{50} değerleri

Gruplar	EC_{50} (-Log)	$E_{max} / KCI*100$
KONTROL (n=7)	6.90±0.72	56.07±17.51
HCT (n=7)	6.16±0.39	56.14±11.07
HCT-MEL (n=7)	6.26±0.33	58.77±16.69
HCT-2MEL (n=7)	6.79±0.56	64.48±4.29
HCT-ATOR (n=7)	6.77±0.22	61.04±7.66

Veriler Ort ±SS olarak ifade edilmiştir.

5.2.2. Asetilkolin gevşeme cevapları

Torasik aortada submaksimal doz Phe kasılması sonrası artan dozlarda ACh uygulamasına gevşeme cevapları Şekil 12 de, bu değerlerden elde edilen E_{max} ve EC_{50} değerleri tablo 7’ de verilmiştir. Hiperkolesterolemi grubunda ACh- E_{max} değerlerindeki azalmayı eş zamanlı melatonin uygulaması engelledi. Tedavi gruplarının hepsinde ACh EC_{50} değerleri hiperkolesterolemi grubuna göre anlamlı arttı ($p<0,05$).



Şekil 12. Asetilkolin doz cevap eğrisi

a, Kontrol grubuna göre Hct grubunda; b, Kontrol grubuna göre Hct-Ator grubunda anlamlı farklılığı göstermektedir. (Two Way Anova) ($p<0,05$).

Tablo 7. Asetilkolin gevşeme cevapları E_{max} ve EC_{50} değerleri

Gruplar	EC_{50} (-Log)	E_{max} (%)
KONTROL (n=7)	6.21±0.13	60.98±8.10
HCT (n=7)	5.37±0.20	51.56±10.43
HCT-MEL (n=7)	6.34±0.58 ^a	60.51±11.35
HCT-2MEL (n=7) (n=7)	6.49±0.34 ^a	52.91±4.11
HCT-ATOR (n=7)	6.91±0.90 ^a	45.00±4.07

Veriler Ort ±SS olarak ifade edilmiştir. a, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,05$)

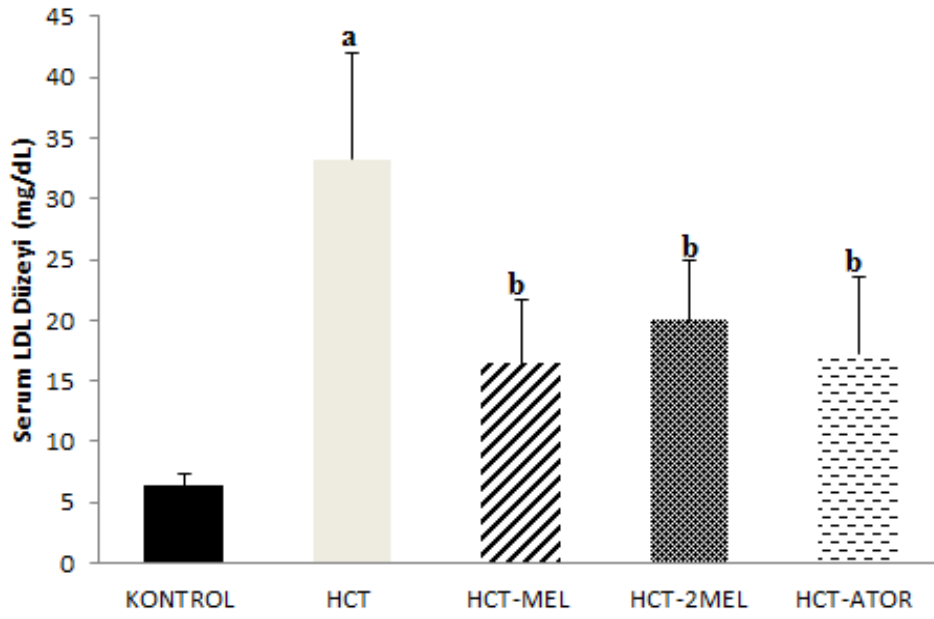
5.3. Serum Lipid Parametreleri ve Aterojenik İndeks

Hiperkolesterolemi grubunda LDL, TK, TG düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı arttı. Melatonin ve atorvastatin uygulanan gruplarda LDL, TK düzeylerinde hiperkolesterolemi grubuna göre anlamlı azaldı. Melatonin uygulaması (eş zamanlı ve son 2 hafta) artan TG seviyesini anlamlı azalttı. Hiperkolesterolemi grubunda anlamlı azalan HDL seviyesi eş zamanlı melatonin ve atorvastatin uygulanan gruplarda anlamlı arttı (Tablo 8, Şekil 13, 14, 15, 16). Hiperkolesterolemi grubuyla artan aterojenik indeks tedavi gruplarında anlamlı azaldı. (Şekil 17).

Tablo 8. Serum lipid parametreleri. a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0,05).

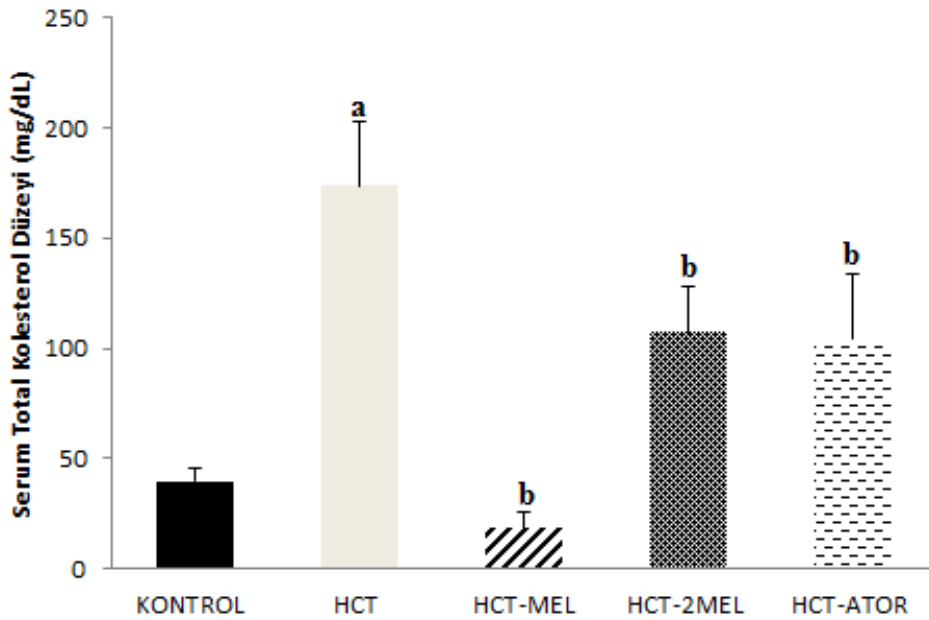
GRUP	LDL (mg/dL)	TK (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL (mg/dL)	Aterojenik İndeks (TK- HDL)/HDL
KONTROL (n=7)	6.4±0.89	39.80±6.14	35±7.87	13.20±1.79	1.93±0.05
HCT (n=7)	33.2±8.76 ^a	173.80±29.28 ^a	78.60±17.47 ^a	8.50±2.09 ^a	20.79±7.75 ^a
HCT-MEL (n=7)	16.4±5.23 ^b	18.40±7.09 ^b	44.80±23.32 ^b	15.94±1.59 ^b	0.19±0.54 ^b
HCT-2MEL (n=7)	20 ±4.95 ^b	107.40±20.23 ^b	44.80±3.03 ^b	12.14±2.04	8.11±2.53 ^b
HCT-ATOR (n=7)	17.20±6.30 ^b	104±29.35 ^b	51±17.12	14.34±3.40 ^b	6.73±3.43 ^b

Veriler Ort ±SS olarak ifade edilmiştir.



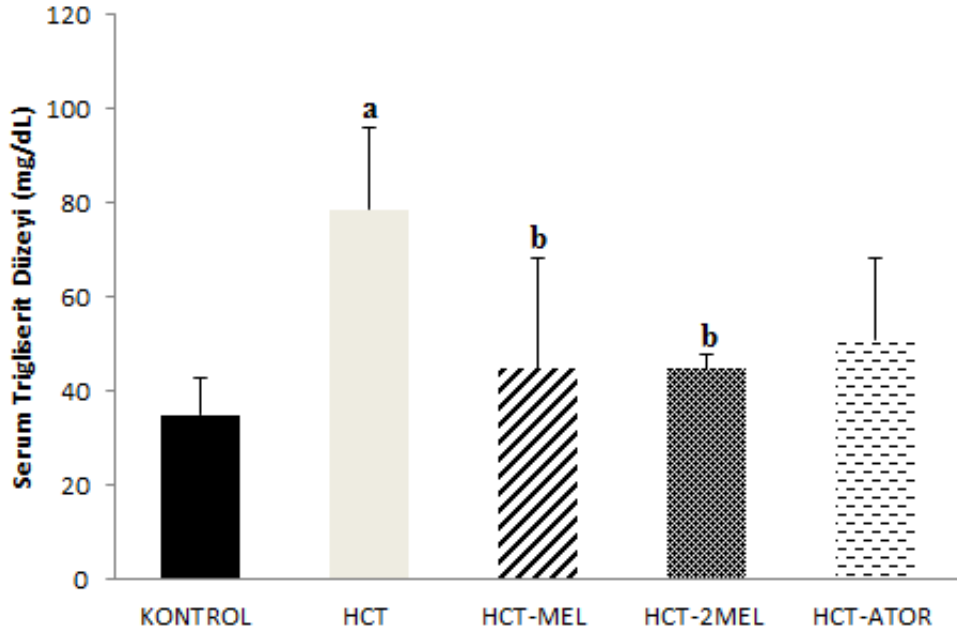
Şekil 13. Serum LDL düzeyleri.

a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).



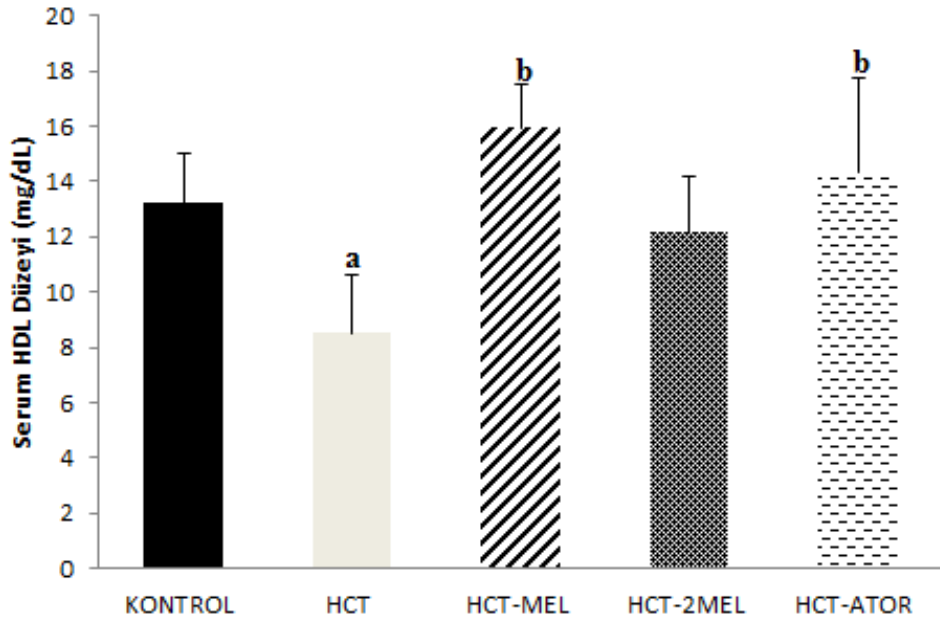
Şekil 14. Serum total kolesterol düzeyi.

a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).



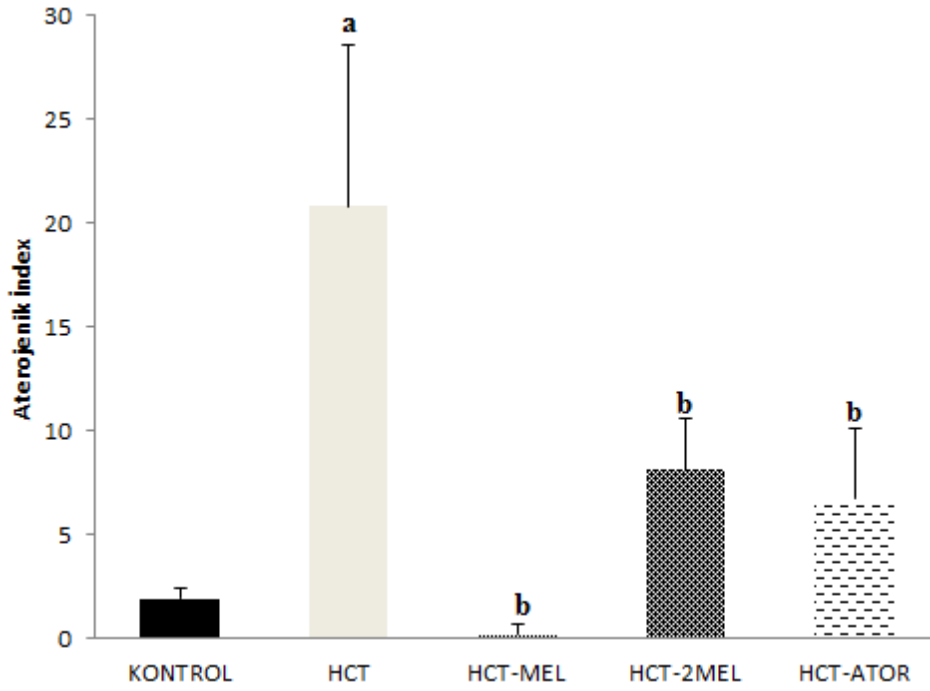
Şekil 15. Serum trigliserit düzeyi.

a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).



Şekil 16. Serum HDL düzeyi.

a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).



Şekil 17. Aterojenik indeks.

a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

5.4. Karaciğer Fonksiyon Testleri

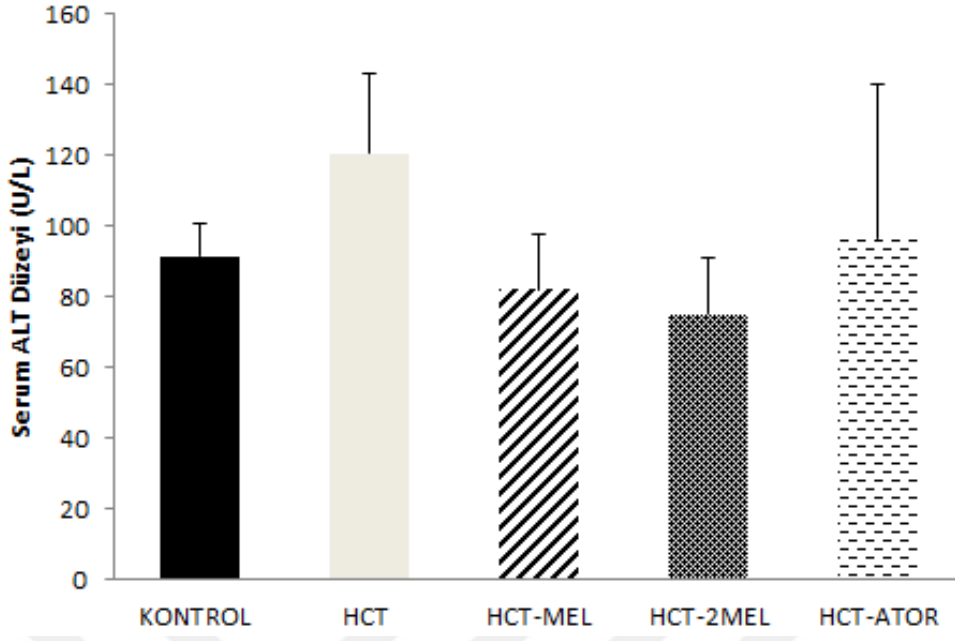
Serum ALT düzeyinde gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi. Serum AST ve GGT Düzeyleri hiperkolesterolemi grubunda anlamlı artarken, melatonin ve atorvastatin uygulanan gruplarda anlamlı azaldı (Tablo 9, Şekil 18, 19, 20).

Tablo 9. Karaciğer fonksiyon testleri.

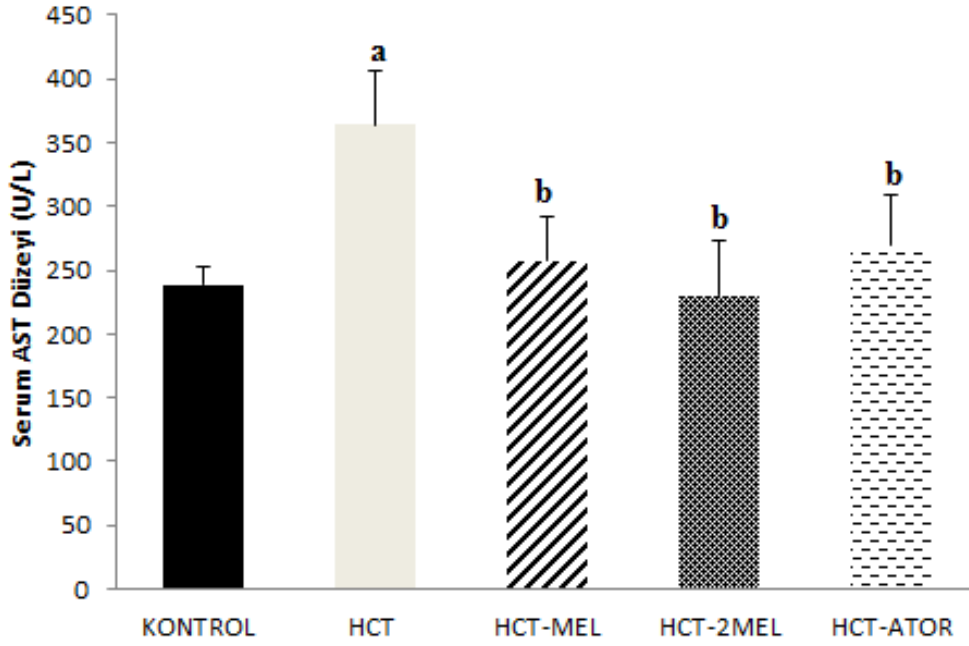
GRUP	ALT (U/L)	AST (U/L)	GGT (U/L)
KONTROL (n=7)	91.40±9.32	238.80±14.62	0.6±0.55
HCT (n=7)	120.60±22.35	363.80±41.60 ^a	2.80±0.45 ^a
HCT-MEL (n=7)	82.20±15.71	257.20±35.15 ^b	1.40±0.55 ^b
HCT-2MEL (n=7)	75±15.78	230±42.96 ^b	1.60±0.55 ^b
HCT-ATOR (n=7)	96.80±43.20	269.20±40.10 ^b	1.40±0.55 ^b

Veriler Ort ±SS olarak ifade edilmiştir.

a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

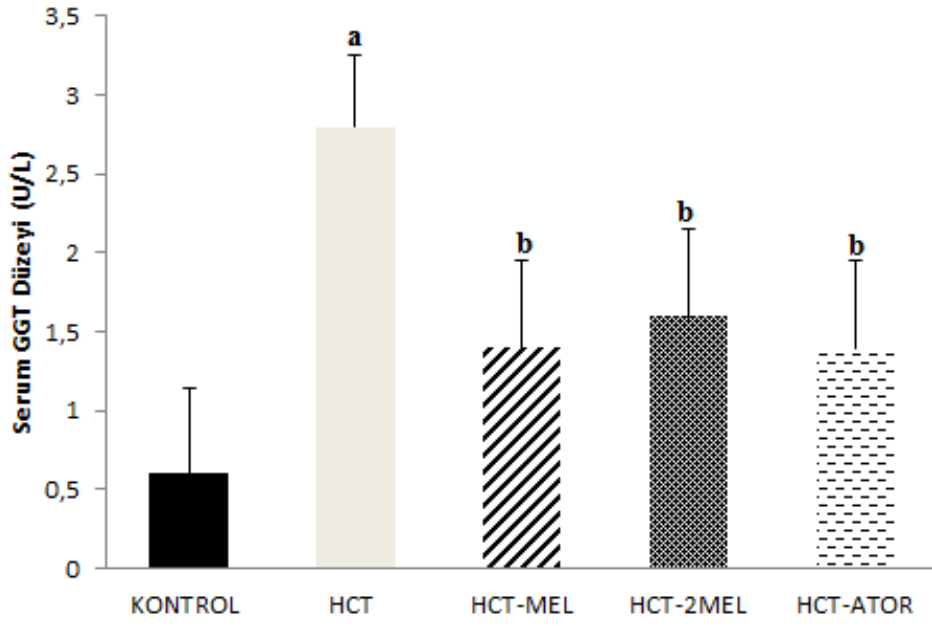


Şekil 18. Serum ALT düzeyi.



Şekil 19. Serum AST düzeyi

a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).



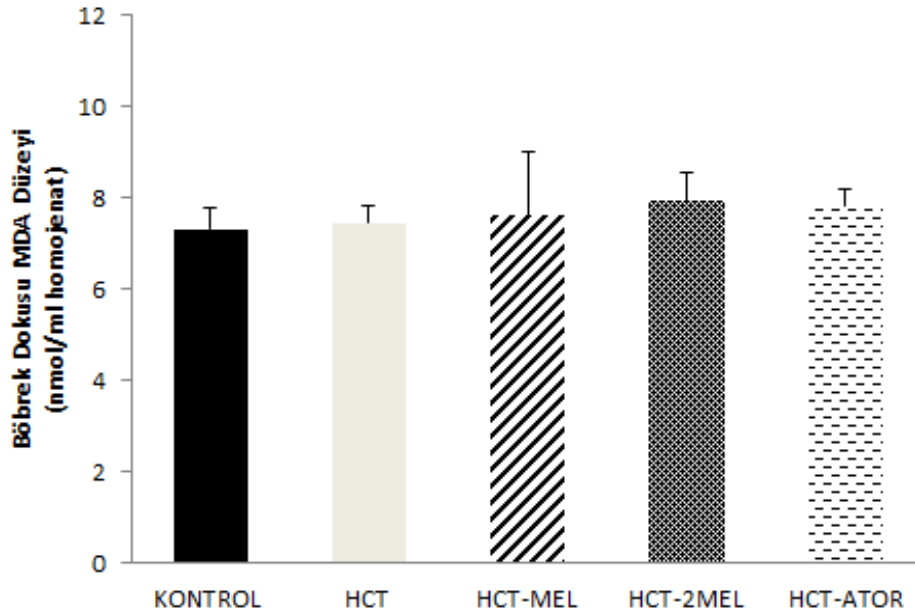
Şekil 20. Serum GGT düzeyi.

a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

5.5. Doku MDA Düzeyleri

5.5.1. Böbrek MDA Düzeyi

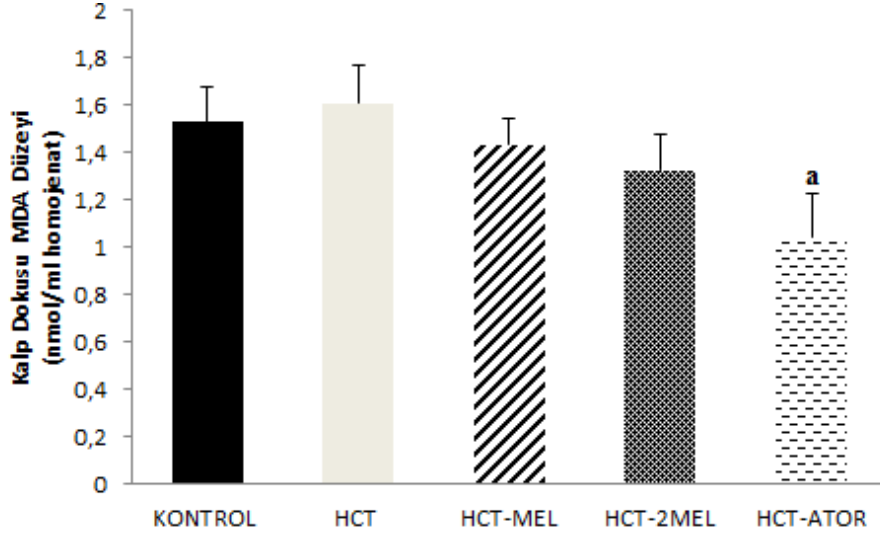
Böbrek dokusu MDA düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı değişiklik gözlenmedi.



Şekil 21. Böbrek dokusu MDA düzeyi

5.5.2. Kalp MDA Düzeyi

Kalp dokusu MDA düzeyi, hiperkolesterolemi grubunda hafif da olsa arttı, atorvastatin uygulanan grupta hiperkolesterolemi grubuna göre anlamlı azaldı.

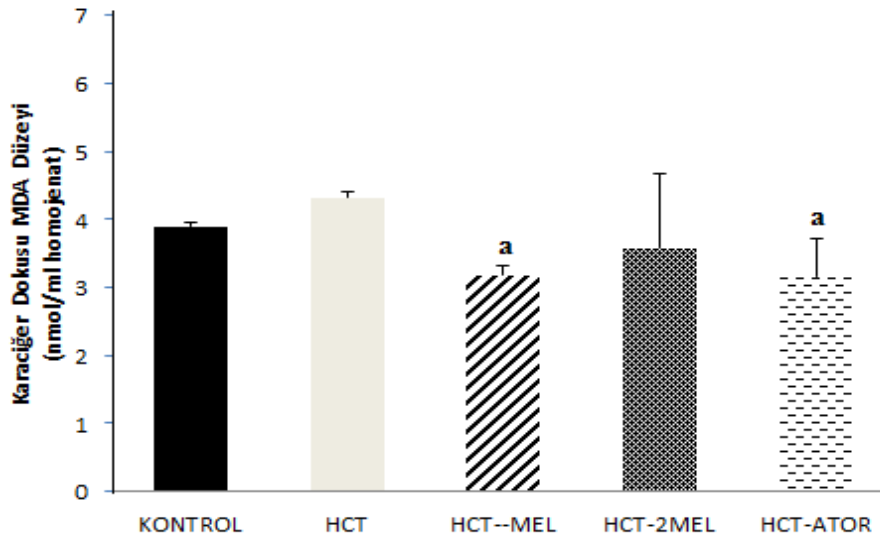


Şekil 22. Kalp dokusu MDA düzeyi.

a, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

5.5.3. Karaciğer MDA Düzeyi

Karaciğer dokusu MDA düzeyinde eş zamanlı melatonin ve atorvastatin uygulanan gruplarda hiperkolesterolemi grubuna göre anlamlı azaldı.



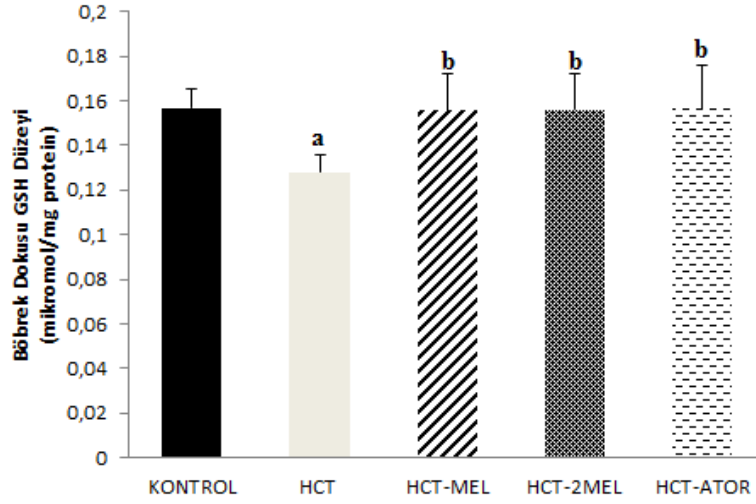
Şekil 23. Karaciğer dokusu MDA düzeyi.

a, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).

5.6. Doku GSH Düzeyleri

5.6.1. Böbrek GSH Düzeyi

Böbrek dokusu GSH düzeyinde hiperkolesterolemi grubunda anlamlı azalırken, tedavi alan grupların hepsinde anlamlı arttı.

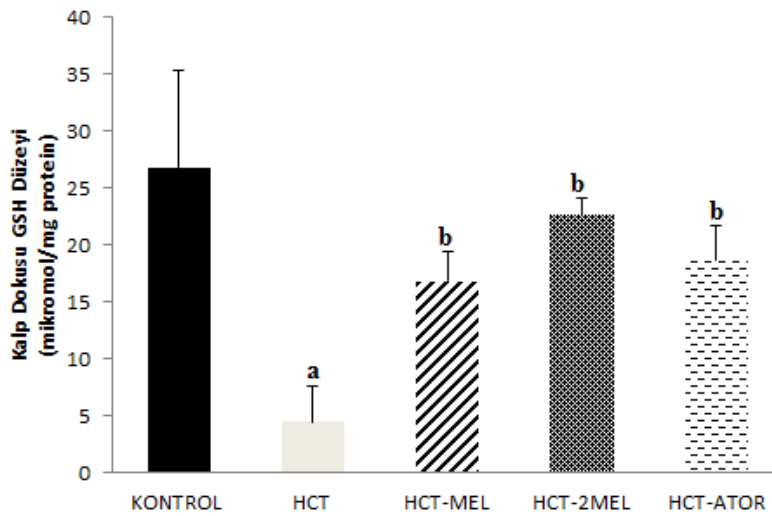


Şekil 24. Böbrek dokusu GSH düzeyi.

a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

5.6.2. Kalp GSH Düzeyi

Kalp dokusu GSH düzeyinde hiperkolesterolemi grubunda anlamlı azalırken, tedavi alan grupların hepsinde anlamlı arttı.

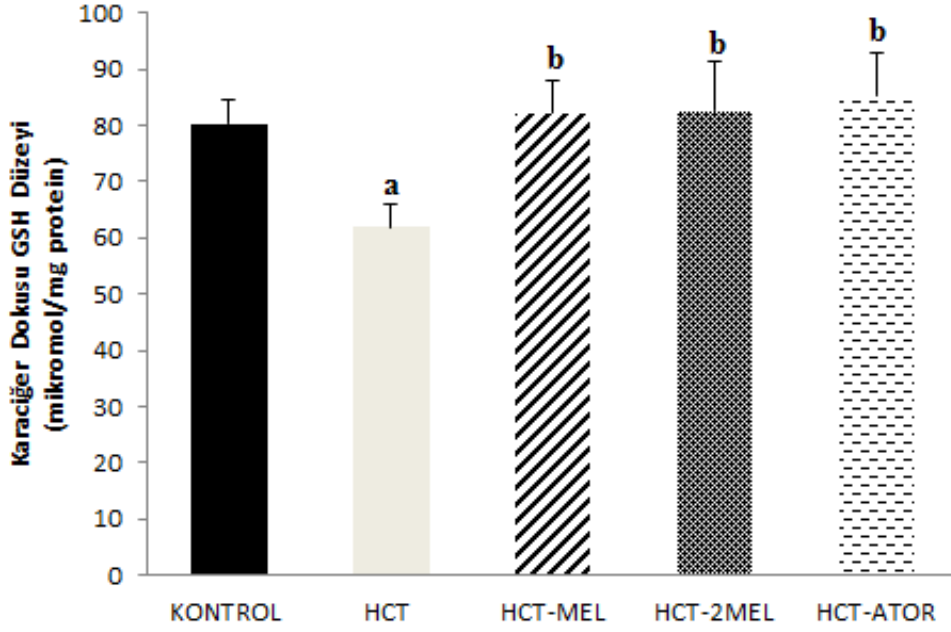


Şekil 25. Kalp dokusu GSH düzeyi.

a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

5.6.3. Karaciğer GSH Düzeyi

Karaciğer dokusu GSH düzeyinde hiperkolesterolemi grubunda anlamlı azalırken, tedavi alan grupların hepsinde anlamlı arttı.



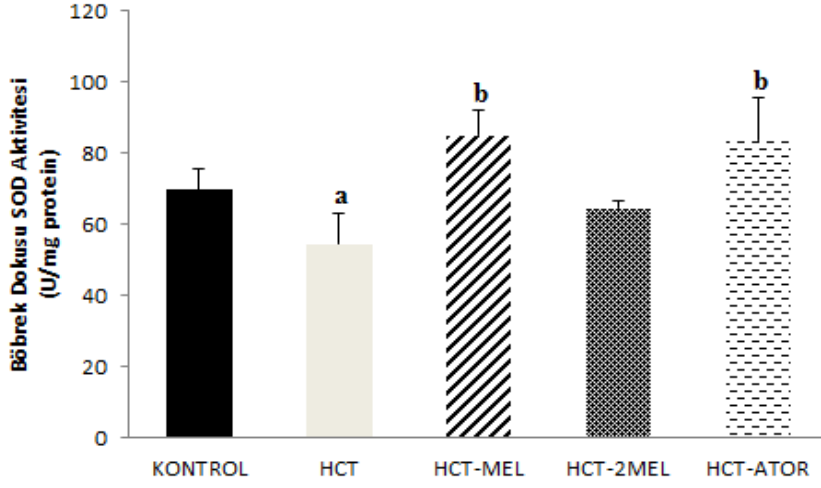
Şekil 26. Karaciğer dokusu GSH düzeyi.

a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

5.7. Doku SOD Aktivitesi

5.7.1. Böbrek SOD Aktivitesi

Böbrek dokusu SOD aktivitesi, hiperkolesterolemi grubunda anlamlı azaldı; eş zamanlı melatonin ve atorvastatin uygulanan grupta anlamlı arttı.

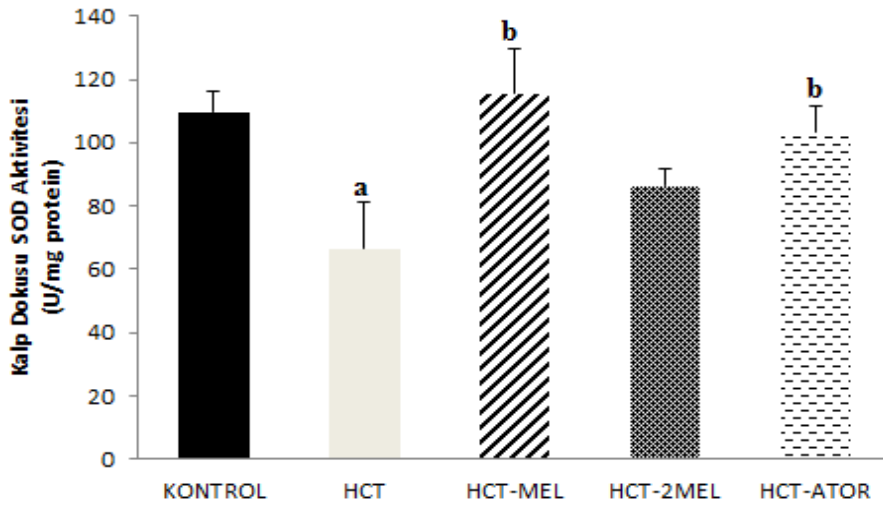


Şekil 27. Böbrek dokusu SOD aktivitesi.

a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0,05).

5.7.2. Kalp SOD Aktivitesi

Kalp dokusu SOD aktivitesi, hiperkolesterolemi grubunda anlamlı azaldı; eş zamanlı melatonin ve atorvastatin uygulanan grupta anlamlı arttı.

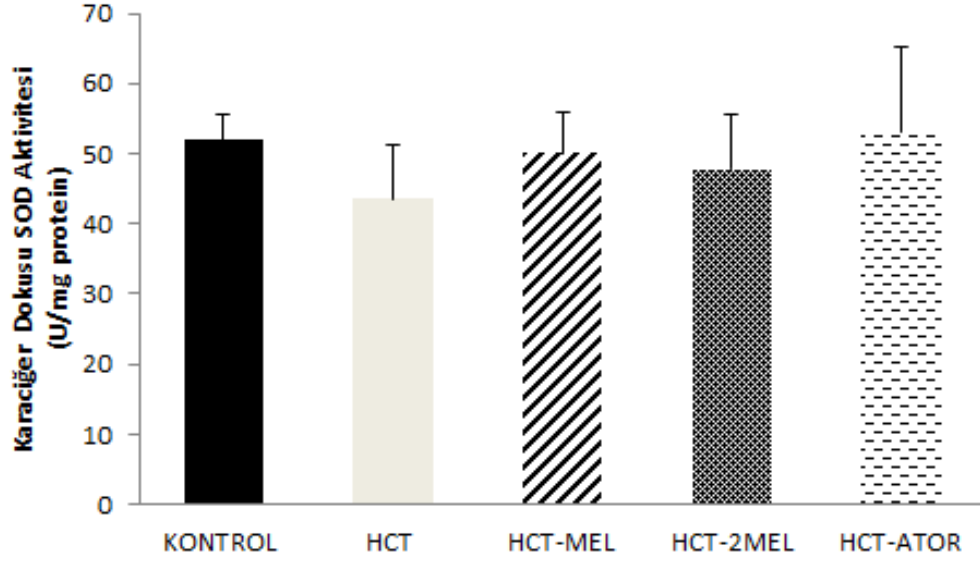


Şekil 28. Kalp dokusu SOD aktivitesi.

a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0,05)

5.7.3. Karaciğer SOD Aktivitesi

Karaciğer dokusu SOD aktivitesinde gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.



Şekil 29. Karaciğer dokusu SOD aktivitesi

5.8. Serum ADMA ölçümleri

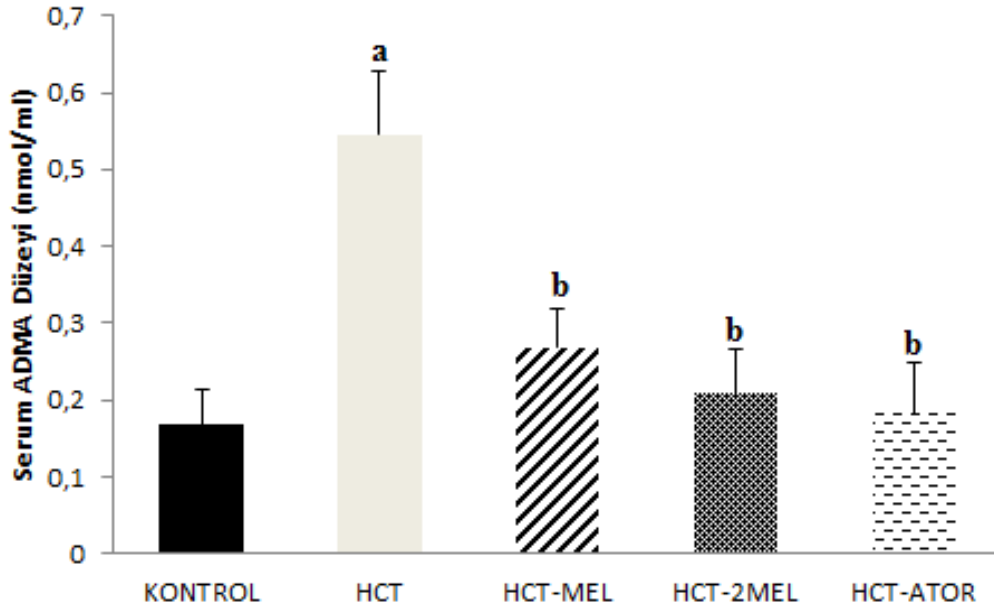
Hiperkolesterolemi grubunda serum ADMA düzeylerinde anlamlı arttı; tedavi gruplarında ise anlamlı azaldı.

Tablo 10. Serum ADMA ölçümleri

GRUPLAR	ADMA (nmol/ mL)
KONTROL (n=7)	0.21±0.07
HCT (n=7)	0.48±0.11 ^a
HCT-MEL (n=7)	0.27±0.05 ^b
HCT-2MEL (n=7)	0.23±0.08 ^b
HCT-ATOR (n=7)	0.19±0.07 ^b

Veriler Ort ±SS olarak ifade edilmiştir.

a, Kontrol grubuna göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0,05).



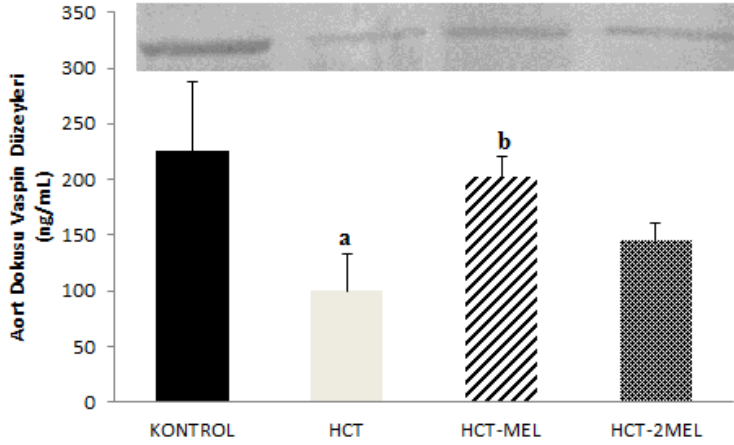
Şekil 30. Serumda ADMA düzeyleri.

a, Kontrole göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (p<0,05).

5.9. Doku Vaspin Ölçümleri

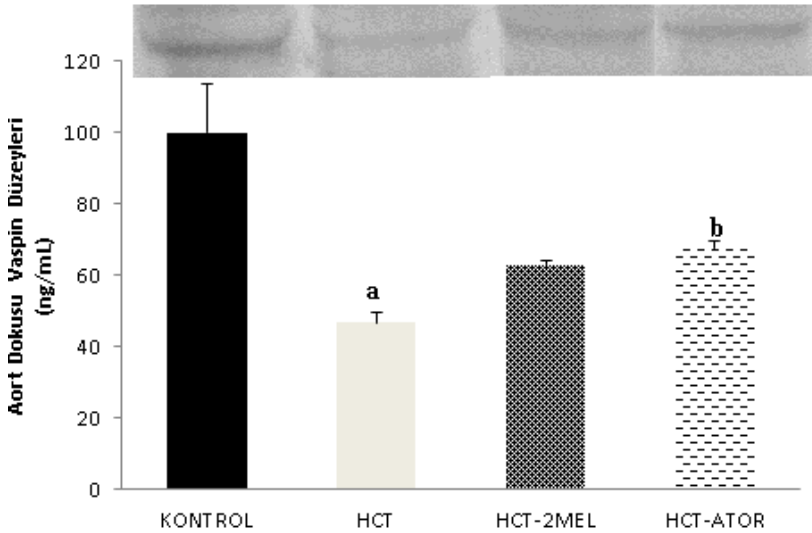
5.9.1. Aort Vaspin Düzeyleri

Aort dokusunda hiperkolesterolemi grubunda anlamlı azalan vaspin düzeyleri, eş zamanlı melatonin ve atorvastatin uygulanan gruplarda anlamlı arttı. Son 2 hafta melatonin uygulanan gruptaki artış anlamlılığa ulaşmadı.



Şekil 31. Aort dokusu eş zamanlı ve son 2 hafta melatonin gruplarında vaspin düzeyleri.

a, Kontrolle göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

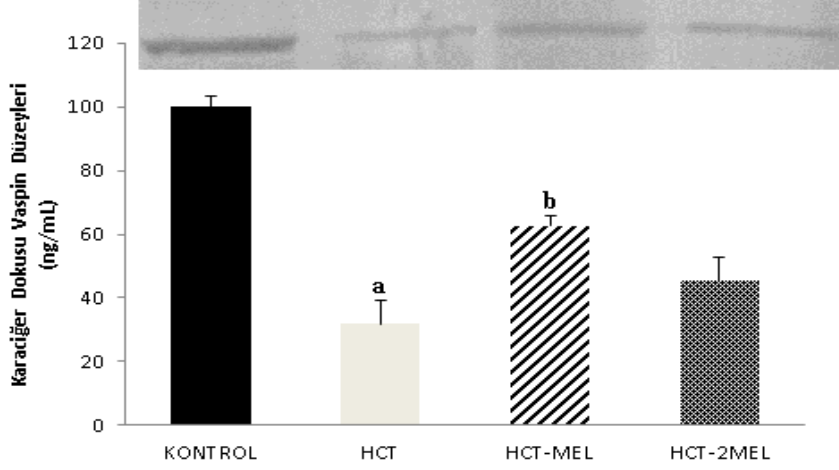


Şekil 32. Aort dokusu son 2 hafta melatonin ve atorvastatin gruplarında vaspin düzeyleri.

a, Kontrolle göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

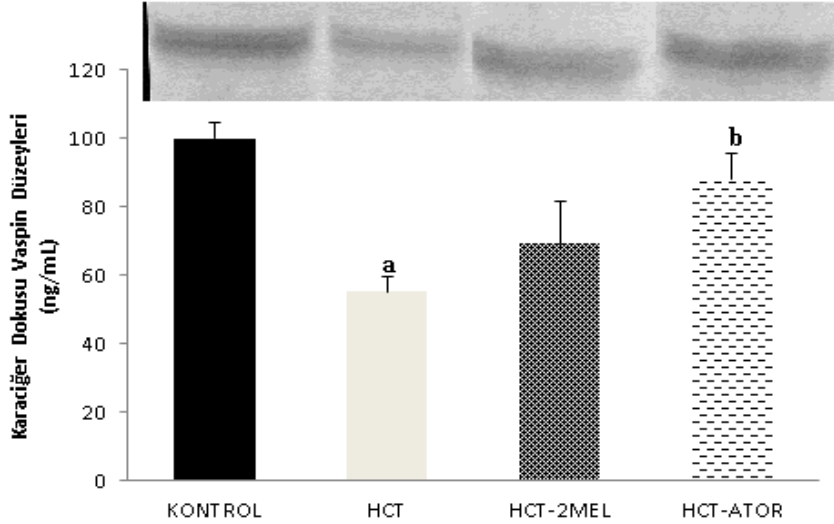
5.9.2. Karaciğer Vaspin Düzeyleri

Karaciğer dokusunda hiperkolesterolemi grubunda anlamlı azalan vaspin düzeyleri, eş zamanlı melatonin ve atorvastatin uygulanan gruplarda anlamlı arttı. Son 2 hafta melatonin uygulanan gruptaki artış anlamlılığa ulaşmadı.



Şekil 33. Karaciğer dokusu eş zamanlı ve son 2 hafta melatonin gruplarında vaspin düzeyleri.

a, Kontrole göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).



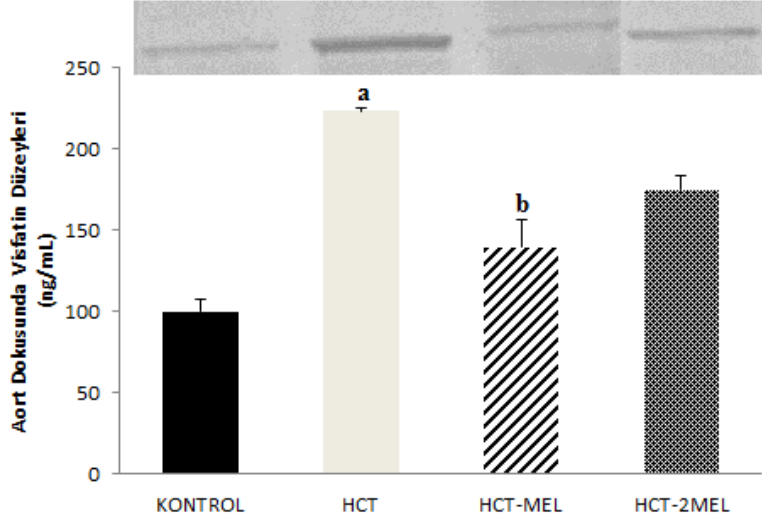
Şekil 34. Karaciğer dokusu son 2 hafta melatonin ve atorvastatin gruplarında vaspin düzeyleri.

a, Kontrole göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

5.10. Doku Visfatin Ölçümleri

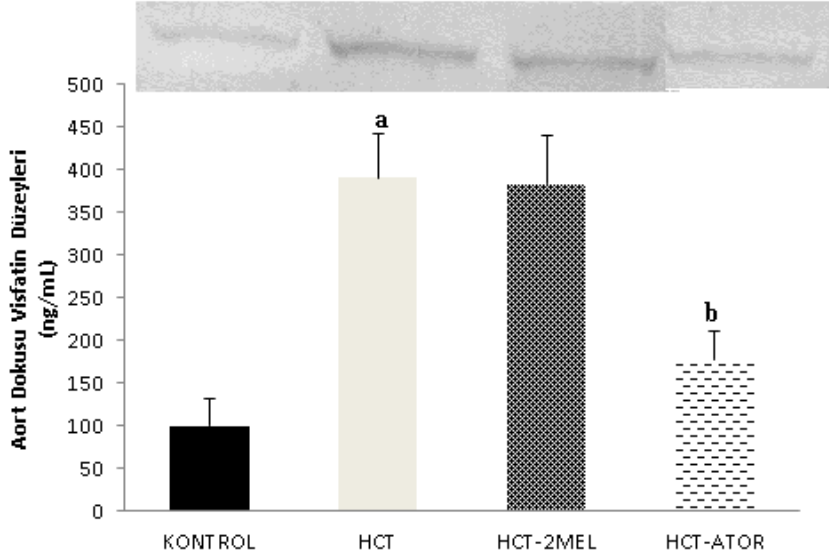
5.10.1. Aort Visfatin Düzeyleri

Aort dokusunda hiperkolesterolemi grubunda anlamlı artan visfatin düzeyleri, tüm tedavi gruplarında anlamlı azaldı.



Şekil 35. Aort dokusu eş zamanlı ve son 2 hafta melatonin gruplarında visfatin düzeyleri.

a, Kontrole göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

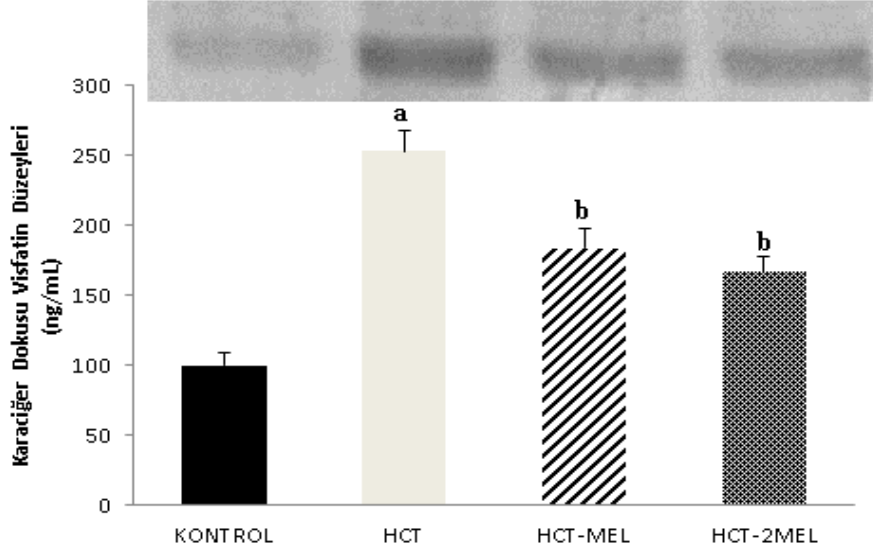


Şekil 36. Aort dokusu son 2 hafta melatonin ve atorvastatin gruplarında visfatin düzeyleri.

a, Kontrole göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

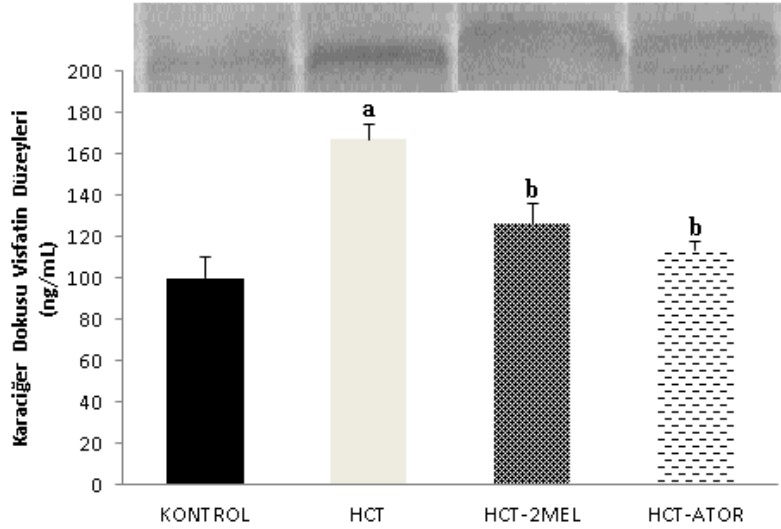
5.10.2. Karaciğer Visfatin Düzeyleri

Karaciğer dokusunda hiperkolesterolemi grubunda anlamlı artan visfatin düzeyleri, tüm tedavi gruplarında anlamlı azaldı.



Şekil 37. Karaciğer dokusu eş zamanlı ve son 2 hafta melatonin gruplarında visfatin düzeyleri.

a, Kontrole göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).



Şekil 38. Karaciğer dokusu son 2 hafta melatonin ve atorvastatin gruplarında visfatin düzeyleri.

a, Kontrole göre; b, Hct grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0,05$).

5.11. Histopatolojik Bulgular

5.11.1 Karaciğerde Mikroskopik Bulgular

Tüm gruplarda karaciğerde belirlenen lezyonların şiddeti Tablo 11' de özetlendi (Tablo 11). Kontrol (Şekil 39/A) ve son 2 hafta melatonin (Şekil 39/D) uygulanan gruplarda karaciğerlerin normal histolojik görünümde olduğu saptandı. Kontrol (Şekil 40/A) ve melatonin (Şekil 40/D) uygulanan gruplarda korunmuş sitoplazma içerisinde belirgin çekirdek ve çekirdekçiğe sahip hepatositlerin kordonsal yapıları oluşturduğu gözlemlendi. En belirgin histolojik değişimler Hct grubunda tespit edildi. Hct grubunda karaciğerlerde periportal ve midzonal bölgelerde daha şiddetli olmak üzere makro veziküler tarzda yağlanma dikkati çekti (Şekil 39/B). Bazı periportal alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonları mevcuttu. Periasiner bölgedeki hepatositlerde hafif şiddette yağlanma ile birlikte bulanık şişkinlik tespit edildi. Yağlanma gözlenen bazı hepatositlerin çekirdeklerinde karyopiknoz şekillendiği dikkati çekti (Şekil 40/B). Hct ile birlikte melatonin uygulanan grupta periportal ve midzonal bölgedeki yağlanma şiddetinin Hct grubuna göre azaldığı (Şekil 39/C) bu bölgelerdeki hepatositlerde bulanık şişkinliğin daha belirgin mikroskopik değişim olduğu dikkati çekti (Şekil 40/C). Hepatositlerde nekrotik değişimler, periportal hücre infiltrasyonu ve sinüzoidal konjesyon şiddeti bakımından Hct grubu ile istatistiksel açıdan farklılık bulunmamakla birlikte sayısal açıdan anılan lezyonların şiddeti anlamlı azaldı. Hct-Ator grubuna ait karaciğerlerde hepatositlerde yağlanmaya rastlanmazken, diğer gruplara göre daha şiddetli bulanık şişkinlik ve sinüzoidal konjesyon dikkati çeken en belirgin bulgulardı (Şekil 39,40/E). Hct grubuna göre daha hafif şiddette hepatositlerde karyopiknoz ve

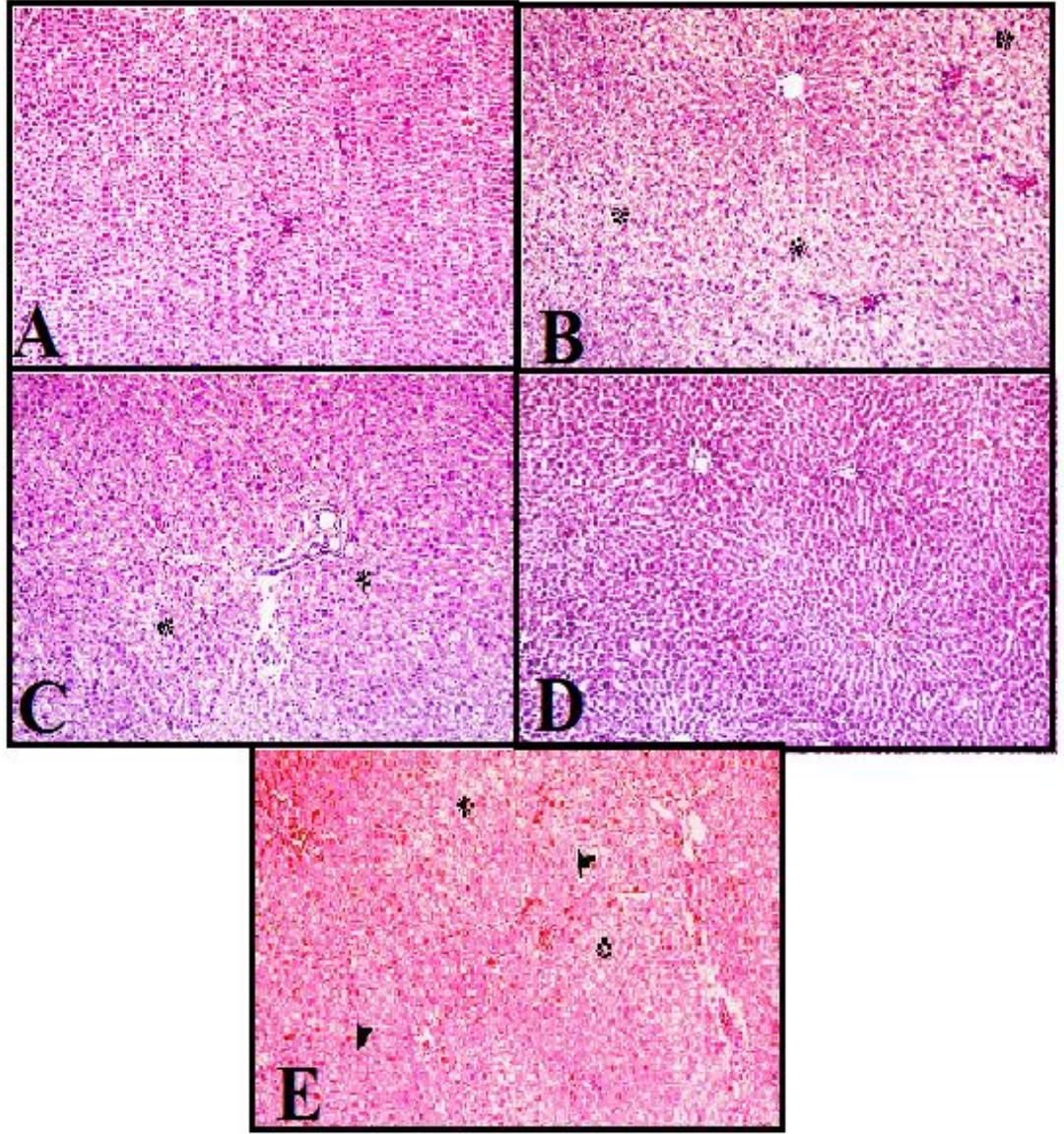
apoptotik değişimler ile birlikte periportal hücre infiltrasyonları Hct-Ator grubunda tespit edilen diğer değişimlerdi.

Tablo 11. Karaciğerde tespit edilen lezyonların gruplara göre şiddeti.

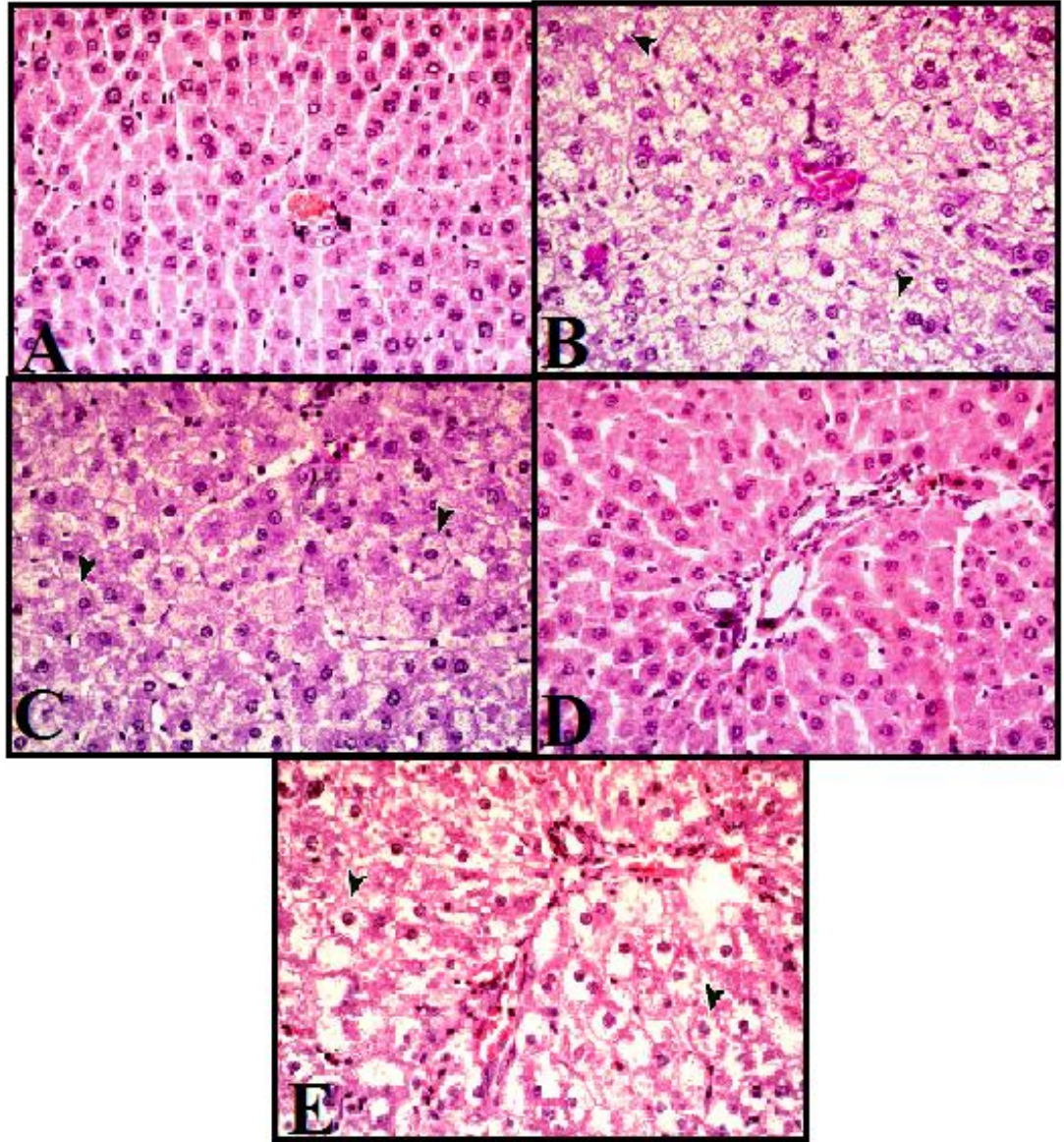
Lezyonlar	KONTROL	HCT	HCT+MEL	HCT- 2MEL	HCT- ATOR	P- değeri
Karyopiknoz	0.00 ± 0.00	0.71 ± 0.40	0.29 ± 0.18	0.00 ± 0.00	0.29 ± 0.18	0.096
Sinuzoidal konjesyon	0.57 ± 0.20	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.86 ± 0.26	1.43 ± 0.30	0.069
Bulanık şişkinlik	0.00 ± 0.00 ^c	1.14 ± 0.26 ^b	0.86 ± 0.26 ^b	0.43 ± 0.20 ^{bc}	1.86 ± 0.34 ^a	0.001
Periportal ve midzonal bölgede yağlanma	0.00 ± 0.00 ^c	2.29 ± 0.29 ^a	1.00 ± 0.00 ^b	0.14 ± 0.14 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	0.001
Periportal hücre infiltrasyonu	0.29 ± 0.18 ^c	1.43 ± 0.20 ^a	1.00 ± 0.00 ^{ab}	0.29 ± 0.18 ^c	0.86 ± 0.14 ^b	0.001
Periasiner yağlanma	0.00 ± 0.00 ^b	1.14 ± 0.34 ^a	0.29 ± 0.18 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.001
Apoptozis	0.14 ± 0.14 ^b	1.43 ± 0.20 ^a	1.29 ± 0.29 ^a	0.29 ± 0.18 ^b	0.29 ± 0.18 ^b	0.001

Veriler ortalama ± standart hata (Ort±SH) olarak ifade edildi.

*a,b,c aynı satırdaki değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,05)



Şekil 39. Karaciğerde görülen lezyonların gruplarda görünümü HE x 50. A. Kontrol grubuna ait karaciğerin histolojik görünümü. B. Hct grubunda periportal, midzonal ve periasiner bölgelerde yağlanmanın görünümü (asteriksler). C. Hct- Melatonin grubunda periportal ve midzonal bölgelerde hafif şiddette dejeneratif değişimlerin görünümü (asteriksler). D. Hct-2mel grubunda karaciğerin histolojik görünümü. E. Hct-Ator grubunda periportal bölgedeki hepatositlerde şiddetli bulanık şişme (asteriksler) ve sinüzoidal konjesyonun (ok başları) görünümü.



Şekil 40. Karaciğerde görülen lezyonların gruplarda görünümü HE x 200. A. Kontrol grubuna ait karaciğerin histolojik görünümü. B. Hct grubunda periportal bölgedeki hepatositlerde makroveziküler yağlanmanın (ok başları) görünümü. C. Hct-Melatonin grubunda periportal bölgedeki hepatositlerde bulanık şişkinliğin (ok başları) görünümü. D. Hct-2mel grubunda periportal bölgenin normal görünümü. E. Hct-Ator grubunda periportal bölgedeki hepatositlerde şiddetli derecede bulanık şişkinliğin (ok başları) görünümü.

5.11.2. Böbrekte Mikroskopik Bulgular

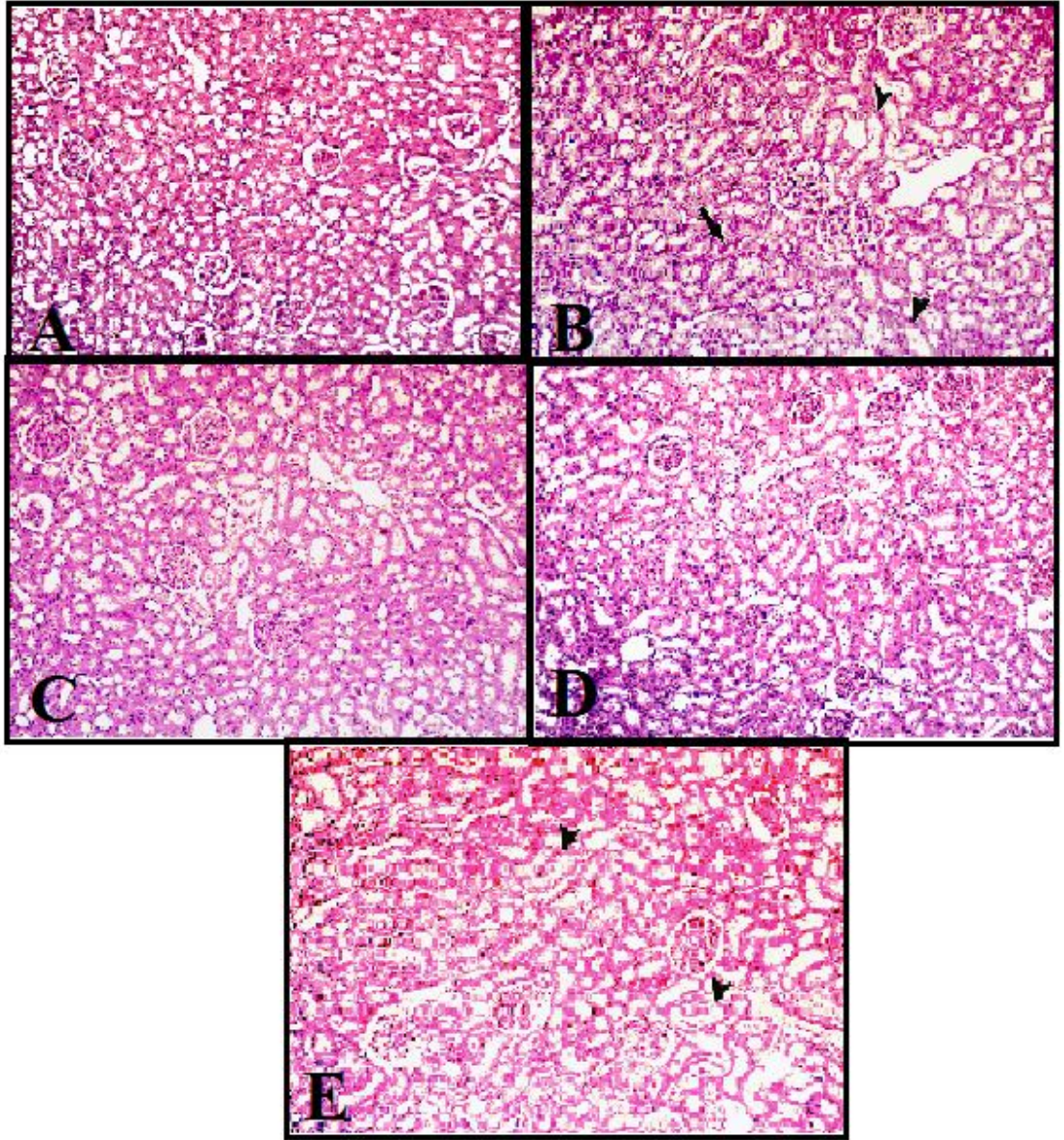
Tüm gruplarda böbrekte belirlenen lezyonların şiddeti Tablo 12' de özetlendi (Tablo 12). Kontrol (41,42/A) ve melatonin (Şekil 41/C-D) uygulanan gruplarda böbreklerin normal histolojik görünümde olduğu saptandı. Hct grubunda tubulus epitel hücrelerinde deskuamasyon, bulanık şişme ile birlikte tubülüs lümenlerinde hiyalin silindir formasyonları ve tubüler dilatasyon en belirgin değişimlerdi (Şekil 41/B). Bu görünlere ek olarak Bowman kapsülünde kalınlaşma ile birlikte mezangial hücrelerde proliferasyon dikkati çekti (Şekil 42/B). Bazı hayvanlarda intertubuler alanlarda mononükleer hücre birikimleri ile karakterize intersitisyel nefritis mevcuttu. Hct + melatonin grubunda ise tubulus epitelindeki nekrotik ve dejeneratif değişimlerin Hct grubuna göre daha hafif şiddette şekillendiği tespit edildi (Şekil 41,42/D). Hct grubunda izlenen intersitisyel hücre infiltrasyonlarına Hct+ melatonin grubunda rastlanmadı. Bu grupta hiyalin silindir formasyonu ve tubular dilatasyon şiddetinde Hct grubuna göre azalma mevcut olmakla birlikte farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildi (P). Atorvastatin uygulaması yapılan grupta genel olarak böbrekteki nekrotik ve dejeneratif değişimler Hct grubuna göre kısmen benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 41,42/E). Ancak bu grupta gözlenen intersitisyel nefritisin diğer deneme gruplarına göre daha belirgin olduğu dikkati çekti (P).

Tablo 12. Böbreklerde tespit edilen lezyonların gruplara göre şiddeti.

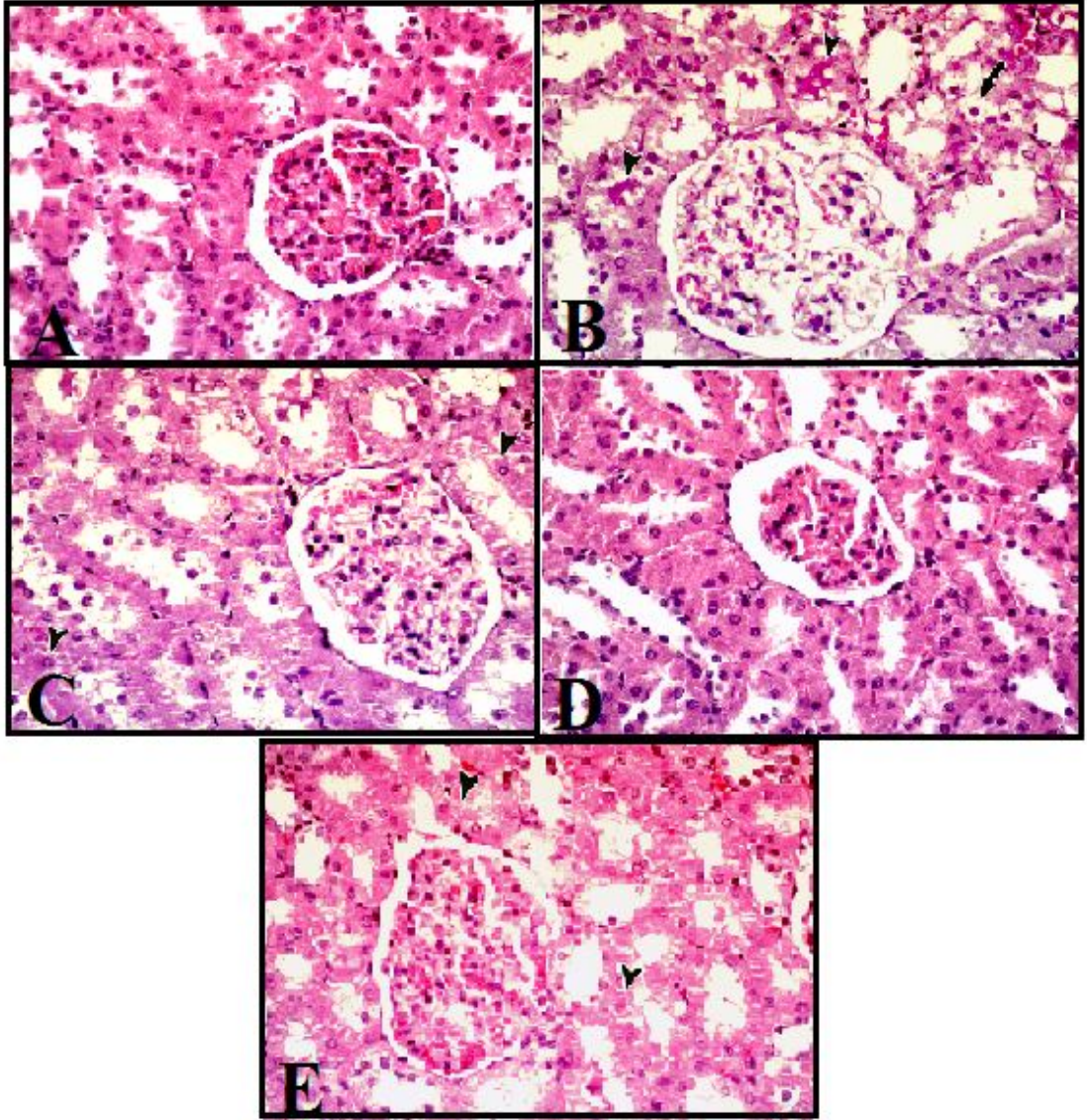
Lezyonlar	Gruplar					P değeri
	<i>KONTROL</i>	<i>HCT</i>	<i>HCT+MEL</i>	<i>HCT-2MEL</i>	<i>HCT-ATOR</i>	
Tubulus epitel hücrelerinde nekroz ve deskuamasyon	0.00 ± 0.00 ^c	2.00 ± 0.22 ^a	1.14 ± 0.26 ^b	0.14 ± 0.14 ^c	1.71 ± 0.29 ^{ab}	0.001
Tubulus epitel hücrelerinde bulanık şişme	0.14 ± 0.14 ^d	2.29 ± 0.18 ^a	1.57 ± 0.20 ^b	0.71 ± 0.18 ^c	1.57 ± 0.20 ^b	0.001
İntratubuler hiyalin damlacığı	0.29 ± 0.18 ^c	2.00 ± 0.22 ^a	1.29 ± 0.18 ^b	0.43 ± 0.20 ^c	1.86 ± 0.14 ^a	0.001
Tubular dilatasyon	0.14 ± 0.14 ^b	2.00 ± 0.22 ^a	1.43 ± 0.20 ^a	0.29 ± 0.18 ^b	1.71 ± 0.29 ^a	0.001
Bowman kapsülünde kalınlaşma	0.00 ± 0.00	0.57 ± 0.20	0.29 ± 0.18	0.00 ± 0.00	0.43 ± 0.30	0.12
İntersitisyel hücre infiltrasyonu	0.00 ± 0.00 ^b	0.43 ± 0.20 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.14 ± 0.14 ^b	1.14 ± 0.40 ^a	0.003

Veriler ortalama ± standart hata (Ort±SH) olarak ifade edildi.

*a,b,c aynı satırdaki değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,05).



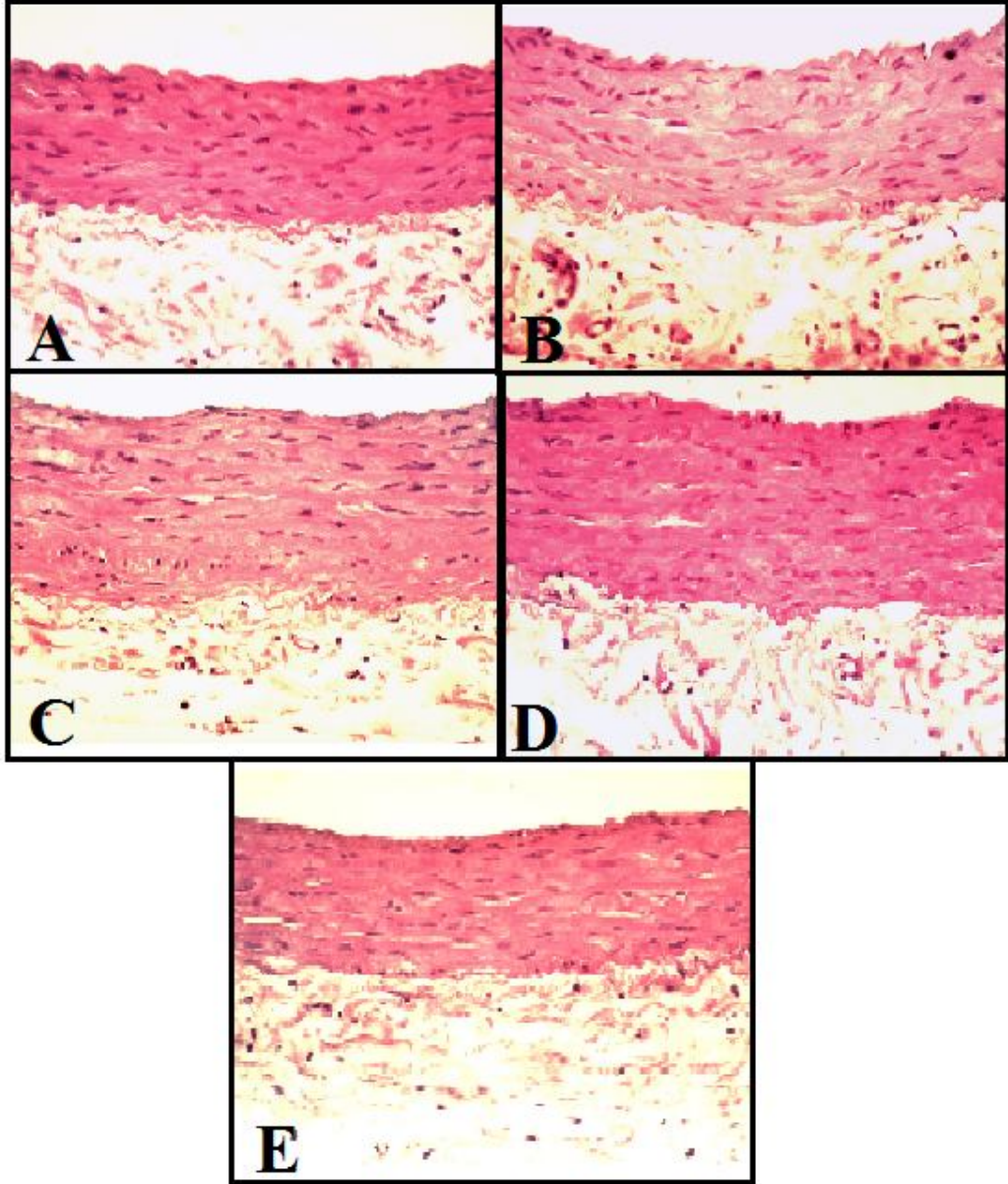
Şekil 41. Böbrekte görülen lezyonların gruplarda görünümü HE x 50. A. Kontrol grubuna ait böbreğin histolojik görünümü. B. Hct grubunda tubul epitelinde nekrotik ve dejeneratif değişimler ile birlikte intratubuler hiyalin silindir formasyonları (ok) ve tubuler dilatasyonun (ok başları) görünümü. C. Hct - Mel grubunda böbreğin histolojik görünümü. D. Hct-2mel grubunda böbreğin histolojik görünümü. E. Hct-Ator grubunda nekrotik ve dejeneratif böbrek korteksinde tubular dilatasyonun (ok başları) görünümü.



Şekil 42. Böbrekte görülen lezyonların gruplarda görünümü HE x 200. A. Kontrol grubuna ait böbreğin histolojik görünümü. B. Hct grubunda intratubuler hiyalin silindir formasyonları (ok başları), tubulus epitelinde vakuoler dejenerasyon (ok), bowman kapsülünde kalınlaşma ve mezengial hücrelerde proliferasyon. C. Hct-Mel grubunda tubulus epitelinde hidropik dejenerasyonun (ok başları) görünümü. D. Hct-2mel grubunda böbreğin histolojik görünümü. E. Hct-Ator grubunda tubulus epitelinde bulanık şişkinliğin (ok başları) görünümü.

5.11.3. Aortta Mikroskopik Bulgular

Kontrol ve tüm tedavi gruplarına ait aorta kesitlerinde mikroskopik olarak herhangi bir lezyona rastlanmadı (Şekil 43).



Şekil 43. Aortta görülen lezyonların gruplarda görünümü HE x 200. A. Kontrol grubunda aortanın görünümü. B. Hct grubunda aortanın görünümü. C. Hct-Mel grubunda aortanın görünümü. D. Hct-2mel grubunda aortanın görünümü. E. Hct-Ator grubunda aortanın görünümü.

6. TARTIŞMA

Çalışmamızda, yüksek kolesterol diyeti uygulanan damar ACh EC₅₀ değeri azalırken; lipid parametreleri, aterojenik indeks ve karaciğer fonksiyon test değerleri arttı. Dokularda oksidatif ve histopatolojik değişimler gözlemlendi. Profilaktik olarak eş zamanlı ve tedavi amaçlı son 2 hafta verilen melatonin tüm bu değişiklikleri engelledi. Melatonin ile elde edilen sonuçlar atorvastatin uygulamasına benzerdir.

Ox-LDL'nin birikimi, aterosklerotik plak oluşumuna katkıda bulunarak; inme miyokard enfarktüsü gibi kalp ve damar hastalıklarına yol açar. Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar düşük düzeyde HDL'nin aterojenik süreçte önemli rol oynadığını göstermiştir. The Framingham Heart Study” (77) “Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)” (78) ve “Lipid Research Clinics” (LRC) (79) programları gibi büyük örneklemeler üzerinde ve uzun süreli yapılan çalışmalar LDL ve non-HDL düzeyleri ile kardiyovasküler hastalığa sahip olma arasında doğrudan bir ilişki olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca son zamanlarda yüksek trigliserid düzeylerinin de koroner kalp hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (80).

Çalışmamızda hiperkolesterolemiyle artan serum LDL, TK seviyeleri, tüm tedavi gruplarında anlamlı azalırken; TG seviyesi sadece melatonin uygulanan gruplarda anlamlı azaldı, atorvastatin grubundaki azalma anlamlılığa ulaşmadı. Hiperkolesterolemiyle düşen HDL seviyesi, tüm tedavi gruplarında anlamlı arttı.

Düşük HDL düzeyi olanlarda statin tedavisinin faydaları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (81, 82). 16 hafta atorvastatin uygulamasıyla hiperkolesterolemik tavşanlarda, HDL düzeyinde artış ve plazma TK, TG ve LDL kolesterol seviyelerinde azalma olduğu rapor edilmiştir (83).

Yapılan çalışmalarda yüksek kolesterol diyeti ile beslenen sıçanlarda melatonin uygulamasının kan kolesterol düzeylerinin azalmasına (84), kolesterol metabolizmasının düzenlenmesine ve oksidatif hasarın önlenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (10). %2 kolesterol ve % 0.5 kolik asit diyeti ile hiperkolesterolemi oluşturulan bir çalışmada, melatonin uygulamasının plazma lipoprotein artışını önemli ölçüde azalttığı ve aynı zamanda LDL oksidasyonunu engellediği gösterilmiştir (85). LDL kolesterol düzeyi yüksek, özellikle de miyokard enfarktüsü ve /veya ani ölüm riski olan, insanların düşük melatonin seviyesine sahip olduğu gösterilmiştir (86).

Melatonin uygulamasının lipid profili üzerine etkisinin Zucker diyabetik obez sıçanlarda ölçüldüğü bir araştırmada, HDL kolesterol seviyesi anlamlı artarken, yağ infiltrasyonu ve trigliserit seviyesi anlamlı azaldı. Bu bulgular sadece yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde görülürken normal yemle beslenmiş kontrol farelerinde gözlenmemiştir (66). Son 2 hafta uygulanan melatoninin, atorvastatin ve eş zamanlı melatonine göre HDL seviyesini arttırmakta yetersiz kalmasının sebebinin tedavi süresi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca, Agil ve ark. (66) yaptığı başka bir çalışmada 6 hafta süreyle melatonin uygulamasının Zucker diyabetik sıçanların total kolesterol seviyelerini etkilemeden LDL seviyesini anlamlı azalttığı rapor edilmiştir (54).

Sıçanlarda, alkole bağlı karaciğer yağlanmasında melatonin koruyucu ve tedavi etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 6 hafta süreyle melatonin tedavisinin serum ve karaciğer trigliserit düzeyini anlamlı azalttığı rapor edilmiştir (87).

Bulgularımız daha önce yapılan çalışmalar ile uyumludur. Çalışmamızda TK seviyesi, eş zamanlı melatonin uygulanan grupta, son 2 hafta melatonin ve

atorvastatin uygulanan gruplara göre daha azdı. Bu sonuç bize profilaktik melatoninin uygulamasının TK seviyesini düşürmede atorvastatinden daha etkili olabileceğini göstermektedir.

Yapılan çalışmalar aterojenik indeksin, koroner ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık riski yansıttığını ve bu risk faktörlerini belirlemede ek katkı sağladığını göstermiştir (88, 89).

Çalışmamızda aterojenik indeks, tedavi gruplarında (özellikle melatonin uygulanan gruplarda) hiperkolesterolemi grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur. Yüksek yağlı diyetle beslenen tavşanlarda yapılan bir çalışmada, aterojenik indeks bizim çalışmamıza benzer şekilde melatonin uygulanan grupta anlamlı azalmıştır (90). Yine tavşanlarda, hipolipidemik çemen tohumlarının etkisinin atorvastatin ile karşılaştırıldığı bir çalışmada aterojenik indeks atorvastatin ile anlamlı azalmıştır (91).

Aterosklerotik risk faktörlerinin belirlenmesinde aterojenik indeksin ayırt edici bir parametre olabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda sıçanların deney öncesi ve deney sonrası canlı ağırlıkları ölçülmüş ve hiperkolesterolemi grubunda anlamlı ağırlık artışı gözlenirken, tedavi grupları (özellikle eş zamanlı melatonin) ağırlıklarında ise anlamlı değişim gözlenmemiştir. Bu durum melatonin ve atorvastatinin kolesterol düşürücü etkisiyle vücut yağ kitlesinin artışını engellediğine işaret edebilir.

Yüksek kolesterol düzeyleri karaciğer hasarına neden olabilir. Klinik laboratuvarlarda GGT enzim aktivitesi serum veya plazmada sensitif karaciğer fonksiyon testi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (91). Amin ve ark. (92) karaciğer transaminazlarının (ALT, AST ve GGT) hiperkolesterolemik sıçanlarda 3

ve 6 hafta sonunda kontrollere kıyasla arttığını göstermişlerdir. Boyd (93) karaciğer nekrozlu hayvanların serum AST aktivitesinin anlamlı arttığını bildirmiştir.

Çalışmamızda hiperkolesterolemi grubunda artan AST ve GGT düzeyi, tedavi gruplarında anlamlı azaldı. ALT ölçümlerimizde hiperkolesterolemi grubunda artış diğer gruplarda azalma gözlenirse de anlamlı değildi.

Vijayabaskar ve ark. (94) yaptığı çalışmada 17 gün hiperkolesterolemik diyetle beslenen sıçanların 7 günlük 1,34 mg/kg/gün atorvastatin tedavisi sonrası karaciğer ALT ve AST değerlerinde düzelme gözlenmiştir. Başka bir çalışmada, hiperkolesterolemik sıçanlarda gavajla uygulanan atorvastatinin (10 mg/kg) karaciğer enzimleri üzerine olumlu sonuçlar gösterdiği rapor edilmiştir (95). Apolipoprotein E-knockout farelerde aort aterosklerotik plaklardaki GGT enzim aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, 8 hafta süreyle yüksek kolesterol diyeti ile eş zamanlı verilen atorvastatinin (5 mg/kg) serum GGT düzeylerini baskıladığı gösterilmiştir. (96).

Letrozol indüklü hepatotoksisitede melatonin karaciğer enzimleri üzerine olumlu etkisi gösterilmiştir (97). Ayrıca nonalkolik steatohepatit hastalarında 12 hafta süreyle melatonin (2×5 mg/gün) uygulamasıyla serum ALT, AST ve GGT düzeylerinde anlamlı azalma olduğu (98), tiyoasetamid ile oluşturulan karaciğer fibrozisi üzerine, 4 hafta boyunca uygulanan melatoninin (10 mg/kg) karaciğer enzimleri (ALT, AST) üzerine olumlu etkisinin olduğu rapor edilmiştir (99).

Çalışmamızda önceki çalışmalara benzer sonuçlar gözlenmiştir ancak tedavi süresinin arttırılmasıyla hiperkolesterolemik diyet alan sıçanların serum ALT düzeylerindeki azalmanın daha fazla olabileceği düşünülmektedir.

Yüksek kolesterol diyeti, lipid peroksidasyonuna neden olan serbest radikalleri arttırır (100). 12 hafta boyunca %1 kolesterol diyeti ile hiperkolesterolemi oluşturulan tavşanlarda kontrol grubuna göre serum MDA düzeyleri daha yüksek, serum SOD aktivitesi ve GSH düzeyinin daha düşük olduğu rapor edilmiştir (101).

Çalışmamızda MDA düzeyleri, kontrole kıyasla hiperkolesterolemi gruplarında artma eğilimindeydi. Böbrek dokusunda gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi. Karaciğer dokusunda eş zamanlı melatonin ve atorvastatin uygulanan gruplarda; kalp dokusunda ise atorvastatin uygulanan grupta hiperkolesterolemi grubuna göre anlamlı azaldı.

GSH düzeyleri böbrek, karaciğer, kalp dokularında hiperkolesterolemi ile anlamlı azaldı; tedavi gruplarında anlamlı arttı. Son 2 hafta uygulanan melatonin grubundaki artma anlamlılığa ulaşmadı.

SOD aktivitesi, böbrek ve kalp dokusunda hiperkolesterolemi ile anlamlı azalırken, eş zamanlı melatonin ve atorvastatin uygulamalarıyla anlamlı arttı. Karaciğer dokusu SOD aktivitesinde gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi.

Streptozosin indüklü böbrek hasarında 8 hafta süreyle atorvastatin (3,97 mg/kg/gün) uygulamasının nefropatide etkisi azalan MDA; artan GSH seviyesi ve SOD aktivitesi ile gösterilmiştir (102). Atorvastatinin hiperkolesterolemik tavşanlarda karaciğer dokusu GSH düzeyi ve SOD aktivitesinin artışıyla protein oksidasyonu ve oksidatif DNA hasarı üzerine yararlı etkilerinin olduğu gösterilmiştir (103). Atorvastatin uygulamasının karaciğerde hücre içi GSH düzeyini artırarak; ROS üretimini ve hücre içi lipid peroksidasyonunu azaltarak hepatotoksik hasara karşı koruduğu rapor edilmiştir (104). Yapılan bir çalışmada, bulgularımızdan farklı olarak yüksek kolesterol diyeti ile birlikte 7 gün atorvastatin (1.4 mg/kg)

uygulanması karaciğer SOD, CAT aktiviteleri ve GSH düzeylerini arttırmamıştır (105). 8 hafta atorvastatin (0.3 mg/ kg/gün) uygulamasının hiperkolesterolemik tavşanların kalp dokusunda SOD düzeyinde anlamlı artış olduğu gösterilmiştir (106).

Deneysel çalışmalar, melatoninin karaciğerde oksidatif stres ile bozulmuş, mitokondri glutasyon redoks döngüsünü düzeltebileceğini göstermiştir (107). Normal şartlarda, melatonin mitokondriyal hidroperoksit seviyelerini azaltır ve glutasyon dengesini düzenler (108). Farmakolojik dozda uygulanan melatonin ile akciğer, barsak, böbrek, karaciğer, beyin, kalp, epifiz bezi ve eritrosit GSH düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (109). Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki melatoninin, GSH, GSSG-Rd, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve glutamil sistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir (62). Sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokusu GSH aktivitesinin, melatonin uygulandıktan 3 saat sonra arttığı gözlenmiştir (110). Casares ve ark. (111) çalışmasında; pankreas iskemi-reperfüzyonuyla oluşturulmuş oksidatif stres modelinde, melatonin tedavisinin antioksidan enzimleri artırdığını; MDA-4HNE düzeyinin azalttığını göstermişlerdir. Anabilim dalımızda yapılan bir çalışmada; sıçanlarda 15 günlük L-NAME uygulamasının kan basıncını ve MDA düzeyini arttırdığı ve GSH düzeyini azalttığı melatonin uygulamasının ise bu etkileri geri çevirdiği gösterilmiştir (112). Melatoninin GSH düzeyini artırıp oksidatif hasarı engelleyerek myokardial hasara karşı koruyucu etkileri gösterilmiştir (113). Hoyos ve ark. (114) yaptığı bir çalışmada sonuçlarımıza benzer şekilde hiperkolesterolemik diyet, çalışılan hiçbir dokuda MDA+4-HDA seviyesini değiştirmemiş, bununla birlikte, kronik melatoninin

uygulanması ile karaciğer, beyin, dalakta MDA+4-HDA seviyesi azalmıştır. Kalpte anlamlı farklılık görülmemiştir.

Tiyoasetamide bağlı karaciğer hasarında melatoninin karaciğer GSH seviyesini düşürerek, inflamatuvar değişiklikleri ve karaciğer fibrozunu büyük ölçüde önlediği gösterilmiştir (99). Melatonin tedavisinin karaciğer hasarına karşı olumlu etkisinin glutasyon antioksidan sistem fonksiyonlarının, karaciğer redoks durumunun geri kazanılması ile olduğu yapılan başka bir çalışmada gösterilmiştir (94). Bulgularımız yapılan çalışmalarla uyumludur.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, radyasyona bağlı nefrotoksisitede, 6 ay süreli melatonin ve genistein tedavisinin albino farelerin böbrek MDA düzeylerini anlamlı azalttığı gösterilmiştir (115).

Çalışmamızda, böbrek MDA düzeylerinde anlamlı farklılığın görülmemesi, deney süresinin kısa olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Yapılan çalışmalarda plazma ADMA yüksekliğinin endotelial fonksiyon bozukluğu ve kardiovasküler olaylar için bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (116). Son dönem böbrek yetmezliği olan 80 hastayla yapılan bir çalışmada plazma ADMA konsantrasyonu aterosklerozu olanlarda olmayanlara göre yüksek bulunmuştur (117). Sağlıklı 115 kişide yapılan çalışmada yüksek ADMA düzeyleri ile karotid arter intima-media kalınlığı arasında anlamlı ilişki gözlemlenmiştir (118).

Çalışmamızda hiperkolesterolemi grubunda artan ADMA seviyesi, tedavi gruplarında anlamlı azaldı.

Çeşitli hiperkolesterolemik tavşan (119) ve insan çalışmalarında (120, 121) atorvastatin tedavisiyle serum ADMA seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Melatoninin kardiyovasküler hastalıklarda ADMA düzeyi üzerine etkisinin

araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır (122, 123). Melatoninin, serum ADMA seviyesini düşürdüğü ve metabolik sendrom, kardiyovasküler komplikasyonların önlenmesi ve/veya tedavisi için faydalı olabileceği gösterilmiştir (124). Safra kanalı ligasyonun yapıldığı bir çalışmada, melatoninin özellikle DDAH-1'i arttırarak karaciğerde ADMA artışlarını engellediği rapor edilmiştir Bu bilgi melatoninin NO/ROS dengesini NO lehine bozarak oksidatif stresi azalttığını göstermektedir (125).

Bizim bilgilerimize göre literatürde hiperkolesterolemide melatoninin serum ADMA seviyelerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamakla birlikte çalışmamızda ilk kez gösterilmiştir. Boger ve ark. (126) LDL kolesterolün ADMA üretimi ile ilişkili bir enzim olan protein arjinin metil transferaz (PRMT)'ın indüksiyonu aracılığıyla insan endotel hücrelerinde ADMA sentezini artırdığını göstermişlerdir. LDL düzeylerindeki düşüşlerle birlikte melatonin ve atorvastatin ADMA düzeylerini belirtilen yoldan azaltmış olabilir.

Vaspin ve visfatin yeni tanımlanmış adipokinlerdir. Son zamanlarda her iki adipokinin de endokrin ve lokal etkilerle aterosklerotik süreçte rol aldıkları düşünülmektedir.

Çalışmamızda karaciğer ve aort dokusu hiperkolesterolemi gruplarında anlamlı azalan vaspin, artan visfatin düzeylerini, melatonin ve atorvastatin uygulamaları arttırdı.

Literatürde serum vaspin ve visfatin düzeyleri ile obezite, diyabet ve kardiyovasküler olaylar arasındaki ilişkiyi araştıran çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte hiperkolesterolemi ile vaspin ve visfatin arasındaki ilişkiyi araştıran sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmaktadır.

Kobat ve ark. (127) serum vaspin düzeylerinin KKH olan kişilerde anlamlı düşük olduğunu göstermişlerdir. Vaspin serum konsantrasyonlarının obezite ve yağ

dağılımı ile ilgili testlerle korelasyon göstermesi, vaspinin obezite ilişkili ateroskleroza katılımcı olmaya yeni bir aday olarak düşünülmesine neden olmaktadır (128). Zhang ve ark. (129) yaptıkları çalışmada düşük plazma vaspin konsantrasyonunun KKH ile ilişkili olduğunu ve koroner arter lezyonu olmayan hastalarda vaspin seviyesine bakılarak gereksiz koroner anjiografiden kaçınılabileceğini savunmuşlardır. Kadoglou ve ark. (130) hiperkolesterolemik hastalarda atorvastatin kullanımının vaspin düzeylerini artırdığını göstermişlerdir.

Visfatin plazma konsantrasyonları muhtemelen lipid metabolizması ve inflamatuvar yanıtla bağlantılıdır. Visfatinin lipid homeostazında önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar yer almaktadır (131). Visfatinin plak destabilizasyonunda rol oynadığı ve plazma visfatin düzeylerinin vasküler endotel fonksiyonları ile negatif korelasyon gösterdiği öne sürülmüştür. Ayrıca akut miyokard enfarktüsü hastalarda monosit ve nötrofillerde visfatin ekspresyonunun arttığı izlenmiş ve bu hastalarda enfarktüse neden olan rüptüre koroner plaklarda immunhistokimyasal boyama ile bol miktarda visfatin görülmüştür (51). Krysiak ve ark. (132) yaptığı bir çalışmada, 19 yüksek risk faktörlü hastaya hipolipidemik ajan olarak 30 gün boyunca statin uygulaması ile plazma visfatin düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir. Visfatinin, kronik böbrek hastalığı olan hastalarda lipid bozuklukları, endotel disfonksiyonu ve ateroskleroz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (133). 8 hafta melatonin tedavisinin, obez farelerin visseral ve subkutan dokularda bulunan visfatin düzeylerini düşürerek enerji metabolizmasının ve antiinflamatuvar yanıtların desteklenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir . Yapılan başka bir çalışmada farelerde, melatonin makrofaj hücre kültüründe, visfatinin indüklü iNOS ekspresyonu ve NO üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (134).

Bizim bilgilerimize göre melatoninin hiperkolesterolemide karaciğer ve aort dokusunda vaspin, visfatin düzeylerine etkisi ile ilgili çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda ilk kez gösterilmiştir.

Aort dokusu histopatolojik incelemelerde gruplar arası anlamlı farklılık görülmedi. Aortta gruplar arasında anlamlı farklılığın görülmemesi hiperkolesterolün aortta yapısal dejenerasyon oluşturması için yeterli deney süresinin olmamasından kaynaklanabilir.

Hiperkolesterolemi grubunda torasik aortada submaksimal doz Phe kasılması sonrası gevşeme cevaplarından elde edilen ACh-E_{max} değerlerindeki azalmayı eş zamanlı melatonin uygulamasının engellediği gözlemlendi. Bu sonuç hiperkolesterolemiyle oluşan endotel disfonksiyonda melatonin endotel gevşetici etkilerinin olduğunu düşündürülebilir.

Melatoninin hipertansiyon üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada (136), kronik melatonin uygulamasının, spontan hipertansif sıçanlarda (SHR) arteriyel kan basıncını azalttığı ve mezenterik arterlerinde endotelium bağımlı gevşeme cevaplarını arttırdığı gösterilmiştir. Rezzani ve ark. (137) SHR larda melatoninle tedavi alan grupla almayan gruba göre asetilkolin indüklü vazodilatasyon cevabının mezenterik arterde iyileştiğini bildirmişlerdir.

Hiperkolesterolemi diğer risk faktörlerinin eksikliğinde bile aterosklerotik lezyon gelişimine neden olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada %2 kolesterol ile 4 hafta beslenmenin tavşan aortasında mikroskopik olarak gözlenebilen lezyon gelişimine neden olabileceği gösterilmiştir (138). Hiperkolesterolemi seviyesi, aortta gözlenen aterosklerotik plağın şiddeti ile orantılıdır (139).

Yazgan ve ark. %2 kolesterol içeren yem ile beslenen tavşanlarda yaptıkları çalışmada aortaların ışık mikroskopisi ile yapılan incelemesinde, kolesterolden zengin

yem ile beslenen grupta endotel tabakasının bütünlüğünün bozulduğu ve intima tabakasında belirgin bir kalınlaşma olduğu, intimadaki hücrelerin sitoplazmalarında lipid birikimi ile köpük hücre kümelerinin oluştuğu ve düz kas hücreleri arasında yer yer lipid damlacıklarının bulunduğu gözlenmiştir (140).

Yapılan bir çalışmada, fruktoz ile beslenen sıçanlarda insülin direnci ile ilişkili vasküler disfonksiyona karşı 8 hafta atorvastatin (10 mg/kg/gün) tedavisinin koruyucu etkisinin olduğu ancak endotel bağımlı gevşemeyi azaltmadığı rapor edilmiştir (141). %1 ve % 0.2 kolik asit diyeti ile hiperkolesterolemi oluşturulan sıçanlarda, 10 mg/L içme suyuyla 3 ay boyunca melatonin uygulaması ile karotis arterde tek çekirdekli hücrelerden oluşan ince bir tabaka ile üretilen yağ çizgilerinin ve endotel kaplı köpük hücrelerinin oluşumunun engellendiği rapor edilmiştir (67).

Melatonin tedavisi ile genetik obez farelerin, ateroskleroz ve hipertansiyon gibi obezite ile ilişkili vasküler hastalıkların riskini azaltmada; dolayısıyla, aortik stenoz ve fibrotik süreci önlemede etkisinin olduğu gösterilmiştir (142).

Çalışmamızda, karaciğer ve böbrekte hiperkolesterolemi grubunda belirgin histopatolojik değişimler gözlenirken, eş zamanlı verilen melatonin grubunda istatistiksel açıdan anlamlılık bulunmaması ile birlikte sayısal açıdan lezyonların şiddetinde azalma olduğu gözlemlendi. Atorvastatin uygulanan grupta, karaciğerde hiperkolesterolemi grubuna göre daha hafif şiddette histopatolojik değişimler gözlenirken; böbrekte ise görülen değişimlerin, hiperkolesterolemi grubuna kısmen benzerlik gösterdiği tespit edildi. Atorvastatin farelerde oksidatif bozulma ve doza bağımlı karaciğer doku toksisitesini araştırmak için 8 hafta süreli 1-5-10 mg/kg/gün olarak uygulanmıştır ve histolojik incelemeler karaciğerde atorvastatinin doza bağımlı toksik etkisini desteklemektedir (143). Çalışmamamızın bulgularına benzer

şekilde, tiyoasetamid indüklü karaciğer fibrozisine karşı melatoninin 4 hafta boyunca 10 mg/kg/gün uygulandığı bir çalışmada, inflamatuvar değişiklikler ve karaciğer fibrozunu karşı melatoninin olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (99).

Yapılan bir çalışmada, melatoninin (20 mg/kg/gün) ve atorvastatinin (10 mg/kg/gün) uygulamasıyla, sıçan böbreğinde gentamisin indüklü nefrotoksisitede koruyucu etkisinin olduğu rapor edilmiştir. Tek başına atorvastatin tedavisine kıyasla, melatonin ve atorvastatinin kombine tedavisinin önemli ölçüde artmış serum kreatinin konsantrasyonu, böbrek ağırlığı, böbrek ROS ve MDA düzeylerini azalttığı GSH düzeyi, SOD ve CAT aktivitelerini arttırdığı gösterilmiştir (144).

Sonuç olarak yüksek kolesterol diyetinin;

- ADMA, MDA düzeyleri, lipid profili, aterosklerotik indeks, karaciğer fonksiyon testleri ve visfatin düzeylerinin artmasına;
- Vaspin, HDL, GSH düzeyi, SOD aktivitesinin azalmasına,
- Endotele bağlı gevşeme cevaplarında azalmaya,
- Özellikle karaciğer ve böbrekte yapısal değişimlere neden olabileceği görülmüştür.

Eş zamanlı melatoninin hiperkolesterolemide;

- HDL kolesterol düzeyini artırması,
- Aterosklerotik indeks, LDL, TG, TK seviyeleri ve karaciğer fonksiyon testlerini (AST, GGT) azaltması,
- Antiaterosklerotik vaspin düzeyini arttırması, proinflamatuvar visfatin düzeyini azaltması,
- Oksidatif stres ile ilişkili lipid peroksidasyon ürünü MDA ve endojen NOS inhibitörü ADMA düzeylerini azaltması,

- Endotel disfonksiyonunu önleyebilmesi,
- GSH ve SOD gibi antioksidan enzimleri arttırması,
- Karaciğer ve böbrekte histolojik değişiklikleri önleyebilmesi,

hiperkolesterelomiye bağlı gelişen patolojilerde koruyucu etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Kolesterol ile eş zamanlı verilen melatonin grubunda çoğu parametrede görülen olumlu değişim kontrol grubuna yakındı. Son 2 hafta uygulanan melatonin ve atorvastatinin eş zamanlı verilen melatonin kadar olmasa da bu parametreler üzerine olumlu etkisi gözlenmiştir ve ilaç uygulama süresinin arttırılmasıyla daha anlamlı tedavi edici etki görülebilir.

Yapılan çalışmalar ve bizim bulgularımız melatoninin hiperkolesterolemi tedavisinde önemli koruyucu ve tedavi edici etkilerinin olabileceğini, atorvastatin ile benzer etkiler oluşturabileceğini ve klinik olarak test edilebileceğini düşündürmektedir.

Yaşlanma ve kardiyovasküler hastalıklarda seviyesi azaldığı rapor edilen, gün içi ritm gösteren melatonin düzeyini yüksek tutmak için yaşam modifikasyonu, ya da toksisitesi düşük melatonin replasmanı önerilerek hiperkolesterolemi ve ilişkili hastalıklardan korunma ve tedavi sağlanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Lipid Research Clinics Program: The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results: I. Reduction in incidence of coronary heart disease. JAMA 1984; 251: 357-64
2. Martin MJ, Hulley SB, Browner WS, et al: Serum cholesterol blood pressure and mortality. Implications from a cohort of 361662 men. Lancet, 1986; 2 :933-936.
3. Landim MBP, Dourado PMM, Chagas and PL. da-Luz A, ACP. High plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine inhibit ischemic cardioprotection in hypercholesterolemic rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2013 May; 46(5): 454-9
4. Aksoy Y, Antioksidan Mekanizmadaki Glutasyonun Rolü. T Klin J Med Sci. 2002; 22: 442-448, Sahna E, Olmez E and Acet A. Effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on ischemia-reperfusion arrhythmias in rats: Can we reduce the incidence of sudden cardiac deaths. J Pineal Res. 2002; 32: 194-198
5. Yamawaki H., Hara N., Okada M., and Hara Y., "Visfatin causes endothelium-dependent relaxation in isolated blood vessels", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 2009 (383): 503–508.
6. Hausenloy D. J., "Drug discovery possibilities from visfatin cardioprotection?" *Current Opinion in Pharmacology*, 2009 (9): 202–207.
7. Chang H. J., "Vaspin protects vascular endothelial cells against free fatty acid-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011 (413): 264–269
8. Hoyos M, Guerrero JM, Perez-Cano R., Oliván J, Fabiani F, Garcia-Pergañeda A, Osuna C, Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. Journal Pineal Research. 2000; 28:150–155
9. Hoyos M, Guerrero JM., Perez-Cano R, Oliván J, Fabiani F, Garcia-Pergañeda A, Osuna C. Long-term melatonin administration increases polyunsaturated fatty acid percentage in plasma lipids of hypercholesterolemic rats. Journal Pineal Research. 2002; 32: 179-186
10. Favero G, Rodella L, Reiter J.R., Rezzani R., Melatonin and its atheroprotective effects. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2013: 25-37.
11. Karaca L, Demirtaş S, Ergüder İ. Lipidler ve Ateroskleroz Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı. 2006; 112.
12. Martin MJ, Hulley SB, Browner WS, et al: Serum cholesterol blood pressure and mortality. Implications from a cohort of 361662 men. Lancet, 1986; 2:933-936.
13. Champe PC, Harvey RA, Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, 2.baskı, Lippincott Williams&Wilkins. 1994; 213-222.
14. Sarandöl A, Sarandöl E, Eker SS, Karaağaç, EU, Hızlı BZ, Dirican M., Kırılı S. Oxidation of Apolipoprotein B containing lipoproteins and serum paraoxonase/arylesterase activities in major depressive disorder, Prog Neuro PsychopharmacolmBiol Psychiatry. 2006; 30(6): 1103-8.
15. Yalçın A, Çetin, M. Plazma Lipoproteinleri ve Klinik Önemi, Uludağ Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı, 2001; 123-129.
16. Betteridge DJ. Lipids and Lipoproteins, Volume1, Groupe Fournier, Martin Dunitz Ltd. 1996; 1-20.
17. Lamarche B, Lemieux I, Despres JP. The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: epidemiology, pathophysiology and therapeutic aspects. *Diabetes Metab*. 1999; 25: 199-211.
18. Mueller PW, Phillips DL, Steinberg KK. Alanine aminopeptidase in serum: automated optimized assay, and effects of age, sex, smoking, and alcohol consumption in a selected population. *Clin Chem* 1987; 33: 363-6.

19. Vakkilainen J, Steiner G, Ansquer JC, et al. Relationships between low-density lipoprotein particle size, plasma lipoproteins, and progression of coronary artery disease: the Diabetes Athero-sclerosis Intervention Study (DAIS). *Circulation*. 2003; 107: 1733-1737.
20. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med*. 1976; 295-369.
21. Kayaalp SO, Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 1. Cilt, 13.Baskı, Ankara: Pelikan Kitabevi, 2012: 490-508.
22. Schwartz SM., Heimark, RL, Majesky, MW. Developmental Mechanisms Underlying Pathology of Arteries, *Physiol Rev*. 1990; 70 (4):1177-209.
23. Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP. (Eds), Braunwald's Heart Disease. 8th Edition 2007; 987-89.
24. Wong BW, Meredith A, Lin D, McManus BM. The biological role of inflammation in atherosclerosis. *Can. J. Cardiol* 2012 ; 28: 631–64.
25. Stary H.C., Chandler A, Dinsmore R, et al. 1995, A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92:1355-1363 p.
27. Wong BW, Meredith A, Lin D, McManus BM. The biological role of 1400 inflammation in atherosclerosis. *Can. J. Cardiol* 2012; 28: 631–64.
28. TİP 2 Diabetes Mellitus'lu Hastalarda Yağ Dokusundan Salınan Adipokinlerin Ateroskleroz Gelişimindeki Rolü. T.C. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı
29. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. National Cholesterol Education Program National Heart, Lung, and Blood Institute. National Institutes of Health, NIH Publication No. 02- 5215 September 2002
30. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.
31. Bonomini, F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol. Histopathol*. 2008; 23: 381–390.
32. Kenneth BB, Bruce NA, The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol Reviews* 1998; 78 (2):547-581.
33. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004 Oct;84(4):1381-478. Review.)
34. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother* 1999; 53(4): 169-80.
35. Akçakoyun M. Koroner Arter Hastalığı Olgularında Koroner Risk Faktörleri İle Endotel Fonksiyonları Arasındaki İlişki. *Kardiyoloji Uzmanlık Tezi*. İstanbul; Sağlık Bakanlığı Koşuyolu Kalp Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2004.
36. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M.T.D, Mazur M., Telzer J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem Cell Biol* 2007; 39 (1): 44-84.
37. Cooke JP. ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med* 2005; 10: 11-7.
38. Böger RH, Vallance P, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atherosclerosis Supplements* 2003; 4: 1–3.
39. Halliwell B. Antioxidants in Human Health and Disease. *Ann Rev Nutr*. 1996; 16: 33.
40. Reiter RJ, Tan DX, Paredes SD, Fuentes-Broto L. Beneficial effects of melatonin in cardiovascular disease. *Ann. Med*. 2010; 42: 276–285.

41. Copola L, Grassia A, Giunta R, Verrazzo G, Cova B, Trille A: Glutathione (GSH) improved haemostatic and haemorheological parameters in atherosclerotic subjects. *Drugs Exp Clin Res* 1992; 8(11/12): 493-98.
42. obezite ve adipokinler, 2014
43. Yüksel S. Tip 2 diabetes mellitus'lu hastalarda yağ dokusundan salınan adipokinlerin ateroskleroz gelişimindeki rolü. Yüksek Lisans Tezi, 2011 Ankara
44. Aust G, Richter O, Rohm S, Kerner C, Hauss J, Kloting N, et al. Vaspin serum concentrations in patients with carotid stenosis. *Atherosclerosis* 2008
45. Gimble JM. "Adipose tissue-derived therapeutics" *Expert Opin Biol Ther* 2003;3(5):705-13).
46. Kaur S, Zilmer K, Leping V, Zilmer M. The levels of adiponectin and leptin and their relation to other markers of cardiovascular risk in patients with psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25(11):1328-33..
47. Li Q, Chen R, Moriya J, Yamakawa J, Sumino H, Kanda T, et al. A novel adipocytokine, visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor (vaspin) , and obesity. *J Int Med Res* 2008; 36: 625-629
48. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science.* 2005 Jan 21;307(5708):426-30. Epub 2004 Dec 16
49. Visfatin ve Etkileri Visfatin and its Effects Gülbahar Uzun Sebahat Özdem Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Antalya, *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2013; 11(3): 119-130
50. Peiró C, Romacho T, Carraro R, Sánchez-Ferrer CF. Visfatin/PBEF/Nampt: A New Cardiovascular Target? *Front Pharmacol* 2010; 1:1-7.
51. Dahl TB, Yndestad A, Skjelland M, Qie E, Dahl A, Michelsen A, et al. Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization. *Circulation* 2007; 115: 972–980
52. Spiroglou, S. G, Kostopoulos, C. G, Varakis, J. N, and Papadaki, H. H. Adipokines in periaortic and epicardial adipose tissue: differential expression and relation to atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb* 2010; 17, 115–130.
53. Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O, Ackermann K, Jilg A, Sebestény T, Maronde E, A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J. Pineal Res.* 2011; 51: 17–43.
54. Hardeland R, Madrid JA, Tan DX, Reite RJ. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J. Pineal Res.* 2012; 52: 139–166.
55. Reiter RJ, Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12: 151-180.
56. Facciola G, Hidestrand M, von Bahr C, Tybring G. Cytochrome P450 1012 isoforms involved in melatonin metabolism in human liver microsomes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2001; 56: 881–888.
57. Slominski RM, Reiter R., Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012; 351: 152–166.
58. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005; 27: 101–110.
59. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* 1993a; 1: 57–60.

60. Tengattini S, Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Rodella LF, Rezzani R. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J. Pineal Res.* 2008; 44: 16–25.
61. Reiter RJ, Tan DX, Paredes SD, Fuentes-Broto L. Beneficial effects of melatonin in cardiovascular disease. *Ann. Med.* 2010b; 42: 276–285.
62. Sahna E, Parlakpınar H, Vardi N, Cığremis Y, Acet A. Efficacy of melatonin as protectant against oxidative stress and structural changes in liver tissue in pinealectomized rats. *Acta Histochem.* 2004;106(5):331-6
63. Sahna E, Parlakpınar H, Ozer MK, Ozturk F, Ozugurlu F, Acet A. Melatonin protects against myocardial doxorubicin toxicity in rats: role of physiological concentrations. *J Pineal Res.* 2003;35(4):257-61.
64. Sahna E, Parlakpınar H, Turkoz Y, Acet A. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion induced infarct size and oxidative changes. *Physiol Res.* 2005;54(5):491-5. Epub 2005 Jan 10.
65. Sahna E, Türk G, Atessahin A, Yilmaz S, Olmez E. Remote organ injury induced by myocardial ischemia and reperfusion on reproductive organs, and protective effect of melatonin in male rats. *Fertil Steril.* 2007 Jul;88(1):188-92. Epub 2007 Feb 20.
66. Agil A, Navarro-Alarcón M, Ruiz R, Abuhamadah S, El-Mir MY, Vázquez GF. Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. *J. Pineal Res.* 2011; 50: 207–212.
67. Pita ML, Hoyos M, Mart-Lacave I, Osuna C, Fernández-Santos JM, Guerrero JM. Long-term melatonin administration increases polyunsaturated fatty acid percentage in plasma lipids of hypercholesterolemic rats. *J. Pineal Res.* 2002; 32: 179–186.
68. Sonmez M, Kurnaz B, Aldemir O, Salar C, Altug S, Bilir T, Altinoz A. Atorvastatin has cardiac safety at intensive cholesterol-reducing protocols for long term, yet its cancer-treatment doses with chemotherapy may cause cardiomyopathy even under coenzyme-Q10 protection. *Cell Biochemistry and Function* 2007; 25 (4): 462-473.
69. Koh KK. Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability. *Cardiovasc Res* 2000; 47(4): 648-657.
70. Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlböry K, Bauer AT, Linz W, Böhm M. Cellular Antioxidant Effects of Atorvastatin In Vitro and In Vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2002; 22: 300-305.
71. Onat E. Nitrik Oksit Sentaz İnhibisyonu Ve Tuz İle Oluşturulan Hipertansiyonda Rosuvastatin Ve Amlodipinin Kan Basıncı, Asimetrik Dimetil Arginin, Isı Şok Proteini 90, Kaveolin-1 Düzeyleri Ve Fenilefrin, Asetilkolin Ve Anjiyotensin II Katılımını İçeren Vasküler Cevaplara Etkileri. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
72. Malhotra HS, Goa KL. Atorvastatin: an updated review of its pharmacological properties and use in dyslipidaemia. *Drugs* 2001; 61 (12): 1835-81.
73. Butun Iİ, Ekmekci H, Ciftci O, Sonmez H, Caner M, Altug T, Kokoglu E. The effects of different doses of melatonin on lipid peroxidation in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Bratisl Lek Listy.* 2013;114(3):129-32.
74. Rindone JP1, Achacoso R. Effect of melatonin on serum lipids in patients with hypercholesterolemia: a pilot study. *Am J Ther.* 1997 Nov-Dec;4(11-12):409-11.
75. Sahna E, Türk G, Atessahin A, Yilmaz S, Olmez E. Remote organ injury induced by myocardial ischemia and reperfusion on reproductive organs, and protective effect of melatonin in male rats. *Fertil Steril.* 2007 Jul;88(1):188-92. Epub 2007 Feb 20.
76. Qian W1, Hasegawa J1, Tsuno S1, Endo Y1, Matsuda A2, Miura N1. Effects of kampo formulas on the progression of hypercholesterolemia and Fatty liver induced by high-cholesterol diet in rats. *Yonago Acta Med.* 2014 Dec;57(4):147-58. Epub 2014 Dec 26.

77. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998 May 12; 97(18): 1837-47.
78. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in primary screenings of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986; 256: 2823-8.
79. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease. *JAMA* 1984 Jan 20; 251(3): 351-64.
80. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012;125(1): 2-220.
81. Svennerholm L, Gottfries CG. Membrane lipids selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset for (type I) and demyelination in late-onset form (type II). *J Neurochem.* 1994; 62: 1039-47.
82. Howland DS, Trusko SP, Savage MJ, Reaume AG, Lang DM, Hirsch JD, et al. Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol. *J Biol Chem.* 1998; 273: 16576-82.
83. Sozer V. Ameliorative effect of statin therapy on oxidative damage in heart tissue of hypercholesterolemic rabbits. *Fundam Clin Pharmacol.* 2015 Aug 27.
84. Hoyos M, Guerrero JM, Perez-Cano R, Olivan J, Fabiani F, Garcia-Pergañeda A, Osuna C. Long-term melatonin administration increases polyunsaturated fatty acid percentage in plasma lipids of hypercholesterolemic rats. *Journal Pineal Research.* 2002; 32: 179-186.
85. Hoyos M, Guerrero JM, Perez-Cano R, Olivan J, Fabiani F, Garcia-Pergañeda A, Osuna C. Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. *J Pineal Res.* 2000 Apr; 28(3): 150-5.
86. Sewerynek E. Melatonin and the cardiovascular system. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002; 1: 79-83.
87. Rui BB, Chen H, Jang L, Li Z, Yang JM, Xu WP, Wei W. Melatonin Upregulates the Activity of AMPK and Attenuates Lipid Accumulation in Alcohol-induced Rats. *Alcohol Alcohol.* 2016 Jan;51(1):11-9.
88. Gill PI, Rathgeb KA, Robinson CS. Regulation of acyl Co A: cholesterol acyl transferase activity in normal and atherosclerotic rabbit aortas: role of a cholesterol substrate pool. *Experimental and Molecular Pathology* 1986; 44: 320-339.
89. Erkan Süt, Enver Avcı, Fusun Üstüner, Erdin Arıkan. Serum Aterojenite Ündeksi Olarak (TG/HDL-K) Oranının Değerlendirilmesi The Evaluation of (TG/HDL-C) Ratio as a Serum Atherogenic Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölüm.,
90. Hussein MR, Ahmed OG, Hassan AF, Ahmed MA. Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model. *Int J Exp Pathol.* 2007 Feb; 88(1): 19-29.
91. Wannamethee G, Ebrahim S, Shaper G. Gamma-glutamyl transferase: Determinants and association with mortality from ischemic heart disease and all causes. *Am J Epidemiol* 1995; 142: 699-708.
92. Amin KA, Abd El-Twab TM. Oxidative markers, nitric oxide and homocysteine alteration in hypercholesterolemic rats: role of atorvastatin and cinnamon, *Int J Clin Exp Med* 2009; 2: 254-265.
93. Boyd JW. The comparative activity of some enzymes in sheep, cattle and rats normal serum and tissue levels and changes during experimental live necrosis *Res Vet Sci* 1962; 3: 256-268.
94. Vijayabaskar P, Sethupathy S. and Somasundaram ST. A comparative study on the atheroprotective potential of heparin and atorvastatin in hypercholesterolemic rats *African Journal of Biochemistry Research* 2008; 2 (5): 120-127.

95. Zarei A, Changizi Ashtiyani S, Taheri S, Rasekh F. Comparison between effects of different doses of *Melissa officinalis* and atorvastatin on the activity of liver enzymes in hypercholesterolemia rats. *Avicenna J Phytomed.* 2014 Jan; 4(1): 15-23.
96. Li G, Wu XW, Lu WH, Ai R, Chen F, Tang ZZ. Effect of atorvastatin on the expression of gamma-glutamyl transferase in aortic atherosclerotic plaques of apolipoprotein E-knockout mice. *BMC Cardiovasc Disord.* 2014 Oct 18; 14: 145.
97. Aydin M, Oktar S, Ozkan OV, Alçin E, Oztürk OH, Nacar A. Letrozole induces hepatotoxicity without causing oxidative stress: the protective effect of melatonin. *Gynecol Endocrinol.* 2011 Apr; 27(4): 209-15.
98. Gonciarz M, Gonciarz Z, Bielanski W, Mularczyk A, Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ. The effects of long-term melatonin treatment on plasma liver enzymes levels and plasma concentrations of lipids and melatonin in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *J Physiol Pharmacol.* 2012 Feb; 63(1): 35-40.
99. Czechowska G, Celinski K, Korolczuk A, Wojcicka G, Dudka J, Bojarska A, Reiter RJ. Protective effects of melatonin against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2015 Aug; 66(4): 567-79.
100. Crawford A, Fassett RG, Geraghty DP. et al. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene.* 2012; 501(2): 89–103.
101. Mikail MA, Ahmed IA, Ibrahim M. et al. *Baccaurea angulata* fruit inhibits lipid peroxidation and induces the increase in antioxidant enzyme activities. *European Journal of Nutrition.* 2015:1–10.
102. Zhou S, Zhao P, Li Y, Deng T, Tian L, Li H. Renoprotective effect of atorvastatin on STZ-diabetic rats through attenuating kidney-associated dysmetabolism. *Eur J Pharmacol.* 2014 Oct 5; 740: 9-14.
103. Aydin S, Uzun H, Sozer V, Altug T. Effects of atorvastatin therapy on protein oxidation and oxidative DNA damage in hypercholesterolemic rabbits. *Pharmacol Res.* 2009 Apr; 59(4): 242-7.
104. Pal S, Ghosh M, Ghosh S, Bhattacharyya S, Sil PC. Atorvastatin induced hepatic oxidative stress and apoptotic damage via MAPKs, mitochondria, calpain and caspase12 dependent pathways. *Food Chem Toxicol.* 2015;83: 36-47.
105. Solanki YB, Bhatt RV. Effects of antioxidant vitamins along with atorvastatin and atorvastatin-niacin combination on diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2010; 2(1): 57-63.
106. Sozer V. Ameliorative effect of statin therapy on oxidative damage in heart tissue of hypercholesterolemic rabbits. *Fundam Clin Pharmacol.* 2015 Aug 27.
107. León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J. Pineal Res.* 2005; 38: 1–9.
108. Martín M, Macías M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 2000; 14: 1677–1679.
109. Pieri C, Maura M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994; 55: 271-276.
110. Pahkla R, Zilmer M, Kullisaar T, Rago L. Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline in vitro. *J Pineal Res* 1998; 24: 96-101.
111. Muñoz-Casares FC, Padillo FJ, Briceño J, Collado JA, Muñoz-Castañeda JR, Ortega R, Cruz A, Túnez I, Montilla P, Pera C, Muntané J. Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *J Pineal Res.* 2006 Apr; 40(3): 195-203.

112. Sahna E, Deniz E, Karabulut A, Burma O. Melatonin protects myocardium from ischemia-reperfusion injury in hypertensive rats: role of myeloperoxidase activity *Clin Exp Hypertens*. 2008; 30: 26-38.
113. Han XH, Xu L. Protective effect of melatonin on myocardial injury in severely- burned rats. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2012 Dec; 24(12): 747-9.
114. Hoyos M, Guerrero JM, Perez-Cano R., Oliván J, Fabiani F, Garcia-Pergañeda A, Osuna C, Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Journal Pineal Research*. 2000; 28: 150–155
115. Canyilmaz E, Uslu GH, Bahat Z, Kandaz M, Mungan S, Hacıislamoglu E, Mentese A, Yoney A. Comparison of the effects of melatonin and genistein on radiation-induced nephrotoxicity: Results of an experimental study. *Biomed Rep*. 2016;4:45-50.
116. Veli-Pekka V, Hannu P, Jukka TS. Risk of coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358: 2127-28.
117. Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: Relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 594–600.
118. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 1141-1146
119. Bolayirli IM, Aslan M, Balci H, Altug T, Hacibekiroglu M, Seven A. Effect of atorva-statin therapy on hypercholesterolemic rabbits with respect to oxidativestress, nitric oxide pathway and homocysteine. *Life Sci*. 2007; 81(2): 121-127.
120. Paiva H, Laakso J, Lehtimäki T, Isomustajarvi M, Ruokonen I, Laksonen R. Effect of high-dose statin treatment on plasma concentrations of endogenous nitric oxide synthase inhibitors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2003; 41 (2): 219-22.
121. Akalin ÇG, Ertorun İ, Akalin A, Alataş İÖ, Musmul A. The effects of atorvastatin on antioxidant/antiinflammatory properties of HDLs in hypercholesterolemics. *Turk J Med Sci*. 2015; 45(2): 345-51.
122. Obayashi K, Saeki K, Kurumatani N. Asymmetric dimethylarginine attenuates the association of melatonin secretion with night-time blood pressure and dipping in elderly individuals. *Circ J*. 2014; 78(12): 2908-14.
123. Tain YL, Huang LT, Hsu CN, Lee CT. Melatonin therapy prevents programmed hypertension and nitric oxide deficiency in offspring exposed to maternal caloric restriction. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 283180.
124. Kantar Ş, Türközkan N, Bircan FS, Paşaoğlu ÖT. Beneficial effects of melatonin on serum nitric oxide, homocysteine, and ADMA levels in fructose-fed rats. *Pharm Biol*. 2015 Jul; 53(7): 1035-41.
125. Tain YL, Kao YH, Hsieh CS, Chen CC, Sheen JM, Lin IC, Huang LT. Melatonin blocks oxidative stress-induced increased asymmetric dimethylarginine. *Free Radic Biol Med*. 2010; 49(6): 1088-98.
126. Boger RH, Sydow K, Borlak J. et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res*. 2000; 87: 99–105.
127. Kobat MA, Celik A, Balin M, Altas Y, Baydas A, Bulut M, Aydin S, Dagli N, Yavuzkir MF, İlhan S The investigation of serum vaspin level in atherosclerotic coronary artery disease. *J Clin Med Res*. 2012;4(2):110-3.
128. Youn BS, Kloting N, Kratzsch J, Lee N, Park JW, Song ES, et al. Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 2008; 57: 372-377.
129. Zhang B, Peng W, Li H, Lu Y, Zhuang J, Wang K, Su Y, Xu Y. *Clin Biochem*. 2013 Jul 11. doi:pii: S0009-9120(13)00305-6. 10.1016/j.clinbiochem.2013.06.028

130. Kadoglou NP, Vrabas IS, Kapelouzou A, et al. Impact of atorvastatin on serum vaspin levels in hypercholesterolemic patients with moderate cardiovascular risk. *Regul Pept* 2011; 170: 57-61
131. Chen CC, Li TC, Li CI, et al. The relationship between visfatin levels an anthropometric and metabolic parameters: association with cholesterol levels in women. *Metabolism* 2007; 56: 1216-20
132. Krysiak R, Zmuda W, Marek B, Okopień B. The effect of short-term combined treatment with simvastatin and ezetimibe on circulating adipokine levels in patients with isolated hypercholesterolemia. *Endokrynol Pol.* 2014;65(4):275-80.
133. Jiao Mu, Bing Feng, Zilin Ye, Fahuan Yuan, Wei Zeng, Zhifeng Luo, Wei Qi Visfatin is related to lipid dysregulation, endothelial dysfunction and atherosclerosis in patients with chronic kidney disease *JNEPHROL* 2011; 24(02): 177-184
134. Kang YS¹, Kang YG, Park HJ, Wee HJ, Jang HO, Bae MK, Bae SK. Melatonin inhibits visfatin-induced inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in macrophages. *J Pineal Res.* 2013 Oct;55(3):294-303.
136. K Laflamme A, Wu L, Foucart S, de Champlain J. Impaired basal sympathetic tone and alpha-1 adrenergic responses in association with the hypotensive effect of melatonin in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1998; 11: 219-229.
137. Rezzani R, Porteri E, De Ciuceis C, Bonomini F, Rodella LF, Paiardi S, et al. Effects of melatonin and Pycnogenol on small artery structure and function in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2010; 55: 1373-1380.
138. Ozer NK, Sirikci O, Taha S, San T, Moser U, Azzi A. Effect of vitamin E and probucol on dietary cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. *Free Radic Biol Med* 1998 Jan 15; 24(2): 226-33.
139. Yao L, Heubi JE, Buckley DD et al. Separation of micelles and vesicles within luminal aspirates from healthy humans: solubilization of cholesterol after a meal. *Journal of Lipid Research* 2002; 43(4): 654–660.
140. Burak Yazgan. Monosit ve aortadaki CD36 ekspresyonunun ateroskleroz açısından değerlendirilmesi. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: 2009.
141. Mahmoud MF, El-Nagar M, El-Bassossy HM, Anti-inflammatory effect of atorvastatin on vascular reactivity and insulin resistance in fructose fed rats. *Arch Pharm Res.* 2012 Jan; 35(1): 155-62.
142. Favero G, Lonati C, Giugno L, Castrezzati S, Rodella LF, Rezzani R. Obesity-related dysfunction of the aorta and prevention by melatonin treatment in ob/ob mice. *Acta Histochem.* 2013 Oct; 115(8): 783-8.
143. Pal S, Ghosh M, Ghosh S, Bhattacharyya S, Sil PC. Atorvastatin induced hepaticoxidative stress and apoptotic damage via MAPKs, mitochondria, calpain andcaspase12 dependent pathways. *Food Chem Toxicol.* 2015 Sep; 83: 36-47.
144. Mehrzadi S, Kamrava SK, Dormanesh B, Motevalian M, Hosseinzadeh A, Hosseini Tabatabaei SM, Ghaznavi H. Melatonin synergistically enhances protective effect of atorvastatin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rat kidney. *Can J Physiol Pharmacol* 2015; 28:1-7.

8. ÖZGEÇMİŞ

12.07.1988 tarihinde Elazığ'da doğdum. İlk, orta öğrenimimi Namık Kemal İlköğretim Okulunda, lise öğrenimimi Ahmet Kabaklı Anadolu Öğretmen Lisesinde tamamladım. 2011 yılında Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun oldum. 2012 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladım. 2012 yılından beri serbest eczacı olarak çalışmaktayım.

