

Deneysel Araştırma

Melatonin, Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarında Bax, Bcl2I1 ve XIAP Düzeylerini Etkileyerek Apoptotik Yolağı Düzenleyebilir

Gülnur ASLAN^{1,a}, Hüseyin Fatih GÜL², Engin ŞAHNA¹, Ebru ÖNALAN³

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

³Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

ÖZET

Amaç: İskemiden sonra kan akımının restorasyonu, iskemik dokunun canlılığını korumak için çok önemlidir. İskemik doku reperfüze edildiğinde, enzim degradasyonu, reaktif oksijen türlerinde aşırı artışa ve apoptoz gibi sekonder yaralanmalara neden olur. Pineal bezden salınan melatonin, önemli endojen antioksidanlardan biridir. Bu çalışmanın amacı; melatoninin, iskem/reperfüzyon (I/R) hasarında proapoptotik B hücreli lenfoma 2 ile ilişkili X (Bax) ile antiapoptotik B hücreli lenfoma 2I1 (Bcl2I1) ve X' e bağımlı apoptoz inhibitörü (XIAP) düzeylerine etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Sıçanlar kontrol, I/R ve I/R+melatonin olmak üzere rastgele 3 gruba ayrıldı. Sol koroner arter 30 dk oklüz ve 120 dk reperfüze edilerek kardiyak hasar oluşturuldu. Melatonin *i.p* enjeksiyonu ile I/R' den önce 10 gün boyunca uygulandı. Bax, Bcl2I1 ve XIAP seviyeleri 'Eş zamanlı PCR' ile analiz edildi.

Bulgular: Doku Bax düzeyleri I/R hasarı ile 1,47 kat artarken, Bcl2I1 ve XIAP düzeyleri azaldı. Melatonin uygulaması, bu değişiklikleri inhibe ederek I/R kaynaklı miyokard hasarına karşı koruma sağladı.

Sonuç: Antiapoptotik XIAP ve Bcl2I1 ve proapoptotik Bax, miyokardiyal I/R patolojisinde sinyal yollarında rol oynayabilir. Melatoninin koruyucu rolüne antiapoptotik aktivitelerinin katkısı olabilir.

Anahtar Sözcükler: Melatonin, İskemi-Reperfüzyon Hasarı, Apoptozis, Bax, Bcl2I1, XIAP, Birc4.

ABSTRACT

Melatonin May Regulate Apoptotic Pathway Via Affecting Bax, Bcl2I1 and XIAP Levels in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury

Objective: Restoring blood flow after ischemia is very important for maintaining the viability of ischemic tissue. When ischemic tissue is reperfused, it causes enzyme degradation, excessive increase in reactive oxygen species and secondary injuries such as apoptosis. Melatonin released from the pineal gland is one of the important endogenous antioxidants. The aim of this study was to investigate the effect of melatonin on proapoptotic B-cell lymphoma 2 associated X (Bax) and antiapoptotic B-cell lymphoma 2I1 (Bcl2I1) and X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) levels by ischemia/reperfusion (I/R) injury.

Material and Method: Rats were randomly divided into 3 groups as control, I/R, and I/R+melatonin. The left main coronary artery was occluded for 30 min followed by 120 min reperfusion. Melatonin was administrated by intraperitoneal injection during the last 10 days before I/R. Bax, Bcl2I1 and XIAP levels were analyzed by real time-PCR.

Results: The tissue Bax levels increased 1,47 fold while Bcl2I1 and XIAP levels decreased with I/R injury. Melatonin administration showed protection against I/R induced myocardial injury by inhibiting all these changes.

Conclusion: Antiapoptotic XIAP and Bcl2I1 and proapoptotic Bax may be involved in signaling pathways in the pathology of myocardial I/R, and the protective role of melatonin may be due to its antiapoptotic activities.

Keywords: Melatonin, Ischemia-Reperfusion Injury, Apoptosis, Bax, Bcl2I1, XIAP, Birc4.

Bu makale atıfta nasıl kullanılır: Aslan G, Gül HF, Şahna E. Melatonin, Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyon Hasarında Bax, Bcl2I1 ve XIAP Seviyelerini Etkileyerek Apoptotik Yolağı Düzenleyebilir. Fırat Tıp Dergisi 2020; 25(3): 111-116.

How to cite this article: Aslan G, Gul HF, Şahna E. Melatonin May Regulate Apoptotic Pathway Via Affecting Bax, Bcl2I1 and XIAP Levels in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. Fırat Med J 2020; 25(3): 111-116.

İskemik kalp hastalığı genel olarak koroner arterin ateromatöz plaklarla tıkanması ve miyokardiyal dokunun metabolik gereksinimlerini karşılamada kan akışının yetersiz kalması ile karakterizedir (1). En önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biri olarak güncelliğini korumaktadır (2). Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre 2016 yılında toplam ölümün % 16,12'si iskemik kalp hastalıklarına bağlı olarak gerçekleşmiştir (3).

İskemiden sonra kan akışının restorasyonu, yani dokunun reperfüzyonu, iskemik dokunun canlılığını koru-

mak için çok önemlidir (4). Bununla birlikte, reperfüzyonda, paradoksal olarak bazı morfolojik değişiklikler, reaktif oksijen türleri (ROS)'nin aşırı artışı, proinflamatuar sitokinlerin artmış salınımı ile inflamatuar yanıt görülür ve dokuda henüz canlı ve kurtarılabilir durumda olan hücrelerin ölümüne yol açabilir (5). Bu olaylar zinciri iskem/reperfüzyon (I/R) hasarı olarak adlandırılır.

Melatonin, güçlü terapötik potansiyeli ile hayvanlarda ve insanlarda kardiyovasküler hastalıklarda çeşitli fizyolojik fonksiyonları olan antioksidan etkili önemli

^aYazışma Adresi: Gülnur ASLAN, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Tel: 0542 234 23 55

Geliş Tarihi/Received: 14.05.2019

e-mail: gulnurecz@gmail.com

Kabul Tarihi/Accepted: 19.12.2019

bir endojen moleküldür (6). Direkt olarak reaktif oksijen ve nitrojen türlerine karşı serbest radikal süpürücü (reseptör bağımsız) ve indirekt olarak da (reseptör bağımlı) antioksidan enzimleri upregüle ve prooksidan enzimleri downregüle etki gösterir (7).

Bir hücrenin yaşamını veya ölümünü modüle etme yeteneği, onun terapötik potansiyeli ile ilişkilidir (8). Apoptotik sinyal yollarının aydınlatılmasının ve anormal apoptozun önüne geçilmesinin hastalıkların tedavisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Myokardiyal hasarda antiapoptotik etki gösteren mitokondriyal regülatör B hücreli lenfoma 211 (Bcl211) (9) ve apoptoz inhibitörü X' e bağımlı apoptoz inhibitörü (XIAP) (10) genlerinin koruyucu etki gösterdiği, proapoptotik B hücreli lenfoma 2 ile ilişkili X (Bax) (11) düzeylerinin ise hasar artışına neden olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada, miyokardiyal I/R hasarında melatoninin apoptotik yollarda görevli genler olan Bax, Bcl211 ve XIAP düzeylerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney hayvanları:

Çalışmada 8 haftalık Sprague Dawley cinsi, 300 gr ağırlığında 21 adet erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından 03/09/2014 tarih ve 172 nolu etik kurul kararınca karşılandı. Sıçanlara 12 saat gün ışığı/12 saat karanlık sıklıta, havalandırılmalı, sabit ısılı (21 ± 1 C°) odalarda ve özel kafeslerde standartlara uygun olarak bakıldı ve beslenmeleri 8 mm' lik standart sıçan pelet yemi ve musluk suyu ile sağlandı. Sıçanlar kontrol grubu, I/R grubu, I/R + melatonin grubu olmak üzere rastgele 3 gruba ayrıldı.

I/R uygulaması

Sıçanlara 1.2 g/kg ürethanın *i.p.* olarak verilmesi ile anestezi uygulandı. Yapay solunum için trakea kanülasyonu yapıldı ve sıçanlar solunum pompasına bağlandı. Karotid artere yerleştirilen bir kanülden, transdüser ve bir kaydedici (Harvard Universal ossilograf (penrecorder)) yardımıyla kan basıncı ve EKG yazdırıldı. Göğsün sol tarafına 1-1.5 cm uzunluğunda bir insizyon yapıldıktan sonra cilt altı dokuları ve göğüs kasları kesildi, sternumun hemen solunda dördüncü kosta kesilerek sol torakotomi yapıldı. Toraks açıldığı anda, içerideki negatif basıncın ortadan kalkması nedeniyle, solunumun devamı ve normal pCO₂, pO₂ ve pH değerlerini korumak amacıyla ventilasyon cihazıyla (Harvard Animal Rodent Ventilator) 1.5ml/100g.'lık hacim ve 60 atım/dk.'lık bir hızla oda havası verilerek pozitif basınçlı solunum uygulanmaya başlandı. Perikardiyum yavaşça sıyrılarak kalp serbestleştirildi ve göğsün sağ tarafına hafifçe basılarak kalp dışarı alındı. 6/0 ipek iplik ve 10 mm'lik yuvarlak uçlu iğneyle sol ana koroner arterin altından miyokard dokusunu da hafifçe içine alacak şekilde hızlıca geçildi. Daha sonra kalp yeniden göğüs içine yerleştirilerek 20 dk stabilizasyon için beklendi. Lambeth Conventions'da belirle-

nen değerlendirme kriterleri göz önüne alınarak bu işlemlere bağlı herhangi bir aritmi görülmesi ya da ortalama kan basıncının oklüzyon öncesi 70 mm Hg nin altına düşmesi halinde denek çalışma dışı bırakıldı. Damarın altından geçirilmiş olan ipliğin uçları 1 mm çap ve 1cm boyundaki ufak bir plastik tüp içinden geçirildi. 20 dk.lık stabilizasyon periyodu sonunda iplik plastik tüp ve bir klemp yardımıyla sıkıştırılarak damarın oklüzyonu sağlandı. İskemi süresi tamamlandığında klemp açılarak tüp içinden geçen ip gevşetilip kalp 120 dakika reperfüze edildi. Deneye son verilmenden önce heparin (Nevparin, Mustafa Nevzat İlaç. İstanbul) uygulandı ve hayvan karotid arterden kanatılarak sakrifiye edildi.

İlaç uygulanması

Melatonin (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.) saf etanolde çözülerek, % 0,9 NaCl ile sulandırıldı, gruplara çözücü olarak aynı hacim ve konsantrasyonda etanol verildi. Melatonin ve çözücü *i.p.* enjeksiyonu ile I/R' den önce 10 gün boyunca verildi.

Biyokimyasal parametreler

Ratlardan alınan kalp örnekleri PCR için RNA later'a batırıldı. RNA later'da gece boyunca doyurulduktan sonra, dokular -80 ° C'de muhafaza edildi. Örnekler mRNA q-Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (AB Applied Biosystems, ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR Instrument, Foster City, CA)'da tespit edildi. Bu amaçla her hayvana ait kalp ve serum doku örnekleri homojenize edildikten sonra doku homojenatından uygun RNA izolasyon kiti (İnvirogen, Ambion by life technologies™ , PureLink™ RNA Mini Kit, Katalog No: 12183018A, ABD) kullanılarak total RNA izole edildi.

mRNA Ekspresyon Düzeyinin Tespiti

Gen ekspresyon düzeyleri qRT-PCR ile gösterildi ve "house-keeping" genlerle (aktin, lamin) normalize edildi. Deney düzeneğinde yer alan farklı deney grupları için her bir mRNA'ya ait qRT-PCR analizi gerçekleştirildi. Kısaca, 1 mikrogram total RNA, qRT-PCR işlemine tabi tutuldu. Bu amaçla öncelikle cDNA (complementary DNA) (AB Applied Biosystems, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, katalog no:437522) sentezi gerçekleştirildi ve hedef mRNA'lara özgü primerlerin kullanıldığı "SYBR Green" tabanlı qPCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Malondialdehit (MDA) ölçümü

MDA konsantrasyonu, Ohkawa ve ark. (12)'nin geliştirdiği yöntemle ölçülmüştür.

İstatistik

Çalışma öncesi uygulanan güç analizine göre; biyokimyasal parametrelerin analizini 0.05 anlamlılık ve %80 bir güç ile belirleyebilmek için her bir grupta en az 7 adet sıçanın çalışmaya alınmasının yeterli olduğu görüldü ($\alpha = 0.05$, $\beta = 0.2$). Veriler SPSS 21.0 programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma olarak belirlendi. Verilerin normallik analizi Shapiro-Wilk testi ile, gruplar arası farklılığın tespiti tek yönlü ANOVA analizi ve

Post Hoc Tukey testi ile yapıldı. $p < 0.05$ olduğunda, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

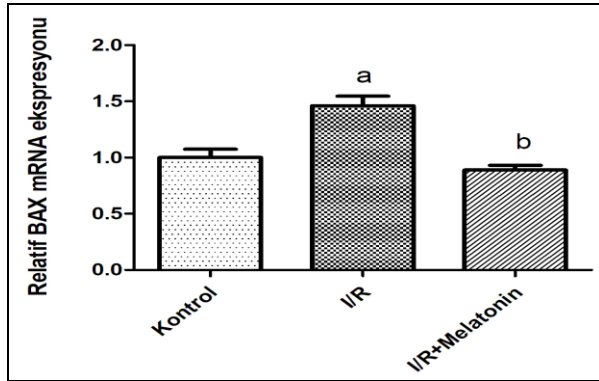
Bax mRNA ekspresyon düzeylerindeki değişiklikleri incelemek için yapılan PCR analizine göre; kontrol grubuyla kıyaslandığında I/R grubuna ait Bax düzeyle-

rinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi ($p = 0.004$). I/R+melatonin grubunda I/R grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p = 0.001$). Bu azalma kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmedi ($p = 0.456$) (Tablo 1, Şekil 1).

Tablo 1. Biyokimyasal parametrelerin gruplara göre değişimi.

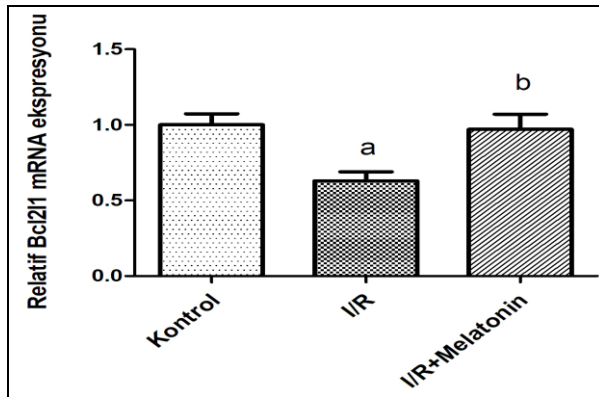
Gruplar	Relatif Bax mRNA ekspresyonu	Relatif Bcl211 mRNA ekspresyonu	Relatif XIAP mRNA ekspresyonu	Doku MDA düzeyi (nmol/g)
KONTROL	1±0,25	1±0,28	1±0,22	12,48±2,03
I/R	1,47±0,28 ^a	0,63±0,22 ^a	0,66±0,2 ^a	47,74±8,99 ^a
I/R+MELATONİN	0,89±0,13 ^a	0,98±0,36 ^b	1,35±0,17 ^{a,b}	21,84±3,5 ^{a,b}

a: Kontrolle göre anlamlı farklılık, b: Melatonin uygulamasına bağlı I/R'ye göre anlamlı farklılık ($p < 0.05$).



Şekil 1. Melatonin ve I/R uygulamalarının Bax mRNA ekspresyonu üzerindeki etkileri. (I/R: iskemi/reperfüzyon).

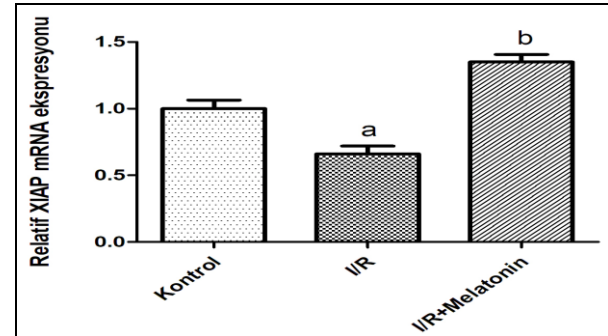
Bcl211 mRNA ekspresyon düzeyleri ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında I/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı azaldı ($p = 0.002$). I/R+melatonin grubunda, I/R grubuna göre anlamlı olarak arttı ($p = 0.026$), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmedi ($p = 0.902$) (Tablo 1, Şekil 2).



Şekil 2. Melatonin ve I/R uygulamalarının Bcl211 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkileri. (I/R: iskemi/reperfüzyon).

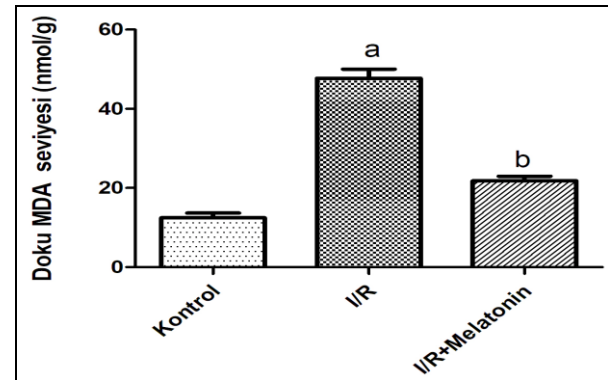
Gruplar arası XIAP mRNA ekspresyon düzey değişimleri incelendiğinde; kontrol grubuyla kıyaslandığında I/R grubunda istatistiksel olarak anlamlı azaldı

($p = 0.007$). I/R ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise I/R+melatonin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p = 0.001$, $p = 0.002$) (Tablo 1, Şekil 3).



Şekil 3. Melatonin ve I/R uygulamalarının XIAP mRNA ekspresyonu üzerindeki etkileri. (I/R: iskemi/reperfüzyon).

Doku MDA düzeyleri incelendiğinde; kontrol grubuyla kıyaslandığında I/R grubun MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($p = 0.001$). I/R grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise MDA düzeylerinde I/R+melatonin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p = 0.001$, $p = 0.001$) (Tablo 1, Şekil 4).



Şekil 4. Melatonin ve I/R uygulamalarının MDA düzeylerine etkileri. (I/R: iskemi/reperfüzyon).

TARTIŞMA

Çalışmamızda I/R hasarı ile doku Bax ve MDA düzeyleri artarken, Bcl2I1 ve XIAP düzeyleri azaldı. Melatonin uygulaması, tüm bu değişiklikleri inhibe ederek I/R kaynaklı miyokard hasarına karşı koruma gösterdi.

Melatoninin oksidatif strese karşı koruyuculuğu bilinmekte ve son yayınlar kardiyoprotektif özelliklerini ortaya koymaktadır (13-15). Yapılan bir çalışmada melatonin iskemiden önce verildiğinde nekroz alanı anlamlı azalmış (13) ve sol ventrikül fonksiyonunu önemli derecede iyileştirmiştir (14). Vażan ve ark. (15) deney boyunca melatonin uygulamış ve bu uygulamanın aritmi süresini anlamlı olarak kısalttığını ve aritmi skorunu azalttığını saptamıştır. Yaşlanma ve koroner arter hastalığı gibi durumlarda endojen melatonin seviyesi düşer (7). Akut koroner sendromlu hastalarda veya miyokard enfarktüsü (MI) sonrasında, gece melatonin seviyesinin ve melatonin metaboliti 6-sulfatoksimeatoninin idrar atılımının azaldığı gösterilmiştir (16). Azalmış melatonin düzeyine bağlı kalbi koruyucu etkilerin eksikliği, iskemik kalp hastalığı da dahil olmak üzere birçok kardiyovasküler patoloji ile ilişkili olabilir (17).

Çalışmamızda I/R deneyleri öncesinde 10 mg/kg/gün melatonin *i.p* olarak uygulandı. Liu ve ark. (18) oluşturduğu deneysel modelde gruplara 2.5 mg/kg, 5 mg/kg ve 10 mg/kg melatonin koroner arter ligasyonundan 10 dk önce, *i.p* enjeksiyon ile uygulandığında, melatonin gruplarında sol ventrikül diyastolik basınç iyileşmiş, miyokard hücrelerinin ATP içeriği anlamlı yüksek bulunmuştur. Melatonin uygulanan gruplar arasında 10 mg/kg melatonin optimum koruma sağladığı görülmüştür. Başka bir çalışmada 10 mg/kg melatoninin *in vivo* I/R' de nekroz alanını ve MDA düzeyini anlamlı azalttığı ve GSH seviyesini artırdığı belirlenmiştir (19). Daha önce yapılan çalışmalarda tek başına melatonin uygulamasının kontrol grubuna göre, kardiyak fonksiyonları (kardiyak output, kalp hızı), transtorasik eko-kardiyografi ölçümlerini, MDA, glutatyon (GSH) ve miyeloperoksidaz (MPO) gibi oksidatif stres ve antioksidan aktivite göstergelerini ve apoptozis regülatörü olan kaspaz-3 aktivitesini değiştirmediği rapor edilmiştir (19-21). Bununla birlikte terminal deoksinükleotidiltransferaz kiti ve ışık mikroskopisiyle yapılan incelemede kontrol+melatonin grubunda izole kalpde programlanmış hücre ölümü belirtileri saptanmamıştır (21). Apoptoz normal hücre döngüsünün hayati bir bileşeni olarak kabul edilir. Anormal apoptoz, nörodejeneratif hastalıklara, iskemik hasara ve birçok kanser türüne eden olur (22). Apoptoz inhibitörleri (Apoptosis inhibitors: IAP'ler) hücre ölümünün kontrolünde rol oynayan anahtar proteinler olarak bilinir (23). Birc4 olarak da bilinen XIAP, apoptozom içerisinde kaspaz-3 aktivasyonunu inhibe ederek hücre ölümünü bloke eder (24). XIAP protein düzeyleri, reoksijenasyona maruz kalan miyositlerde azalmıştır (25). Artan XIAP seviyelerinin, kaspaz-3'ü inhibe ederek I/R'den sonra hem miyokard apoptozunu hem de enfarktüsünü azalttığı (10) ve böbrek (26) ve retina (27) fonksiyonunu koruduğu göster-

ilmiştir. XIAP inhibitörü uygulamasının miyokardiyal apoptozu uyararak I/R hasarını arttırdığı rapor edilmiştir (10). Yaşlanma ile birlikte XIAP ekspresyonunun azaldığı bildirilmiş ve beyin hipokampusünde yaşa bağlı nöron azalmasının, melatonin sekresyonunun azalmasına bağlı olarak artan apoptoz ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (28). Başka bir çalışmada ise melatonin, sığır oositlerinde XIAP ekspresyonunu arttırmış ve embriyonik gelişimi olumlu yönde etkilemiştir (29). Antioksidan bir flavonoid olan tilianin, miyokard dokusundaki XIAP ekspresyonunu önemli ölçüde arttırmıştır (30). Bizim çalışmamız, I/R hasarı ile azalan XIAP seviyesinin, melatonin tedavisi ile anlamlı olarak arttığını gösterdi. Bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında da anlamlıydı. 10 gün boyunca 10 mg/kg melatonin uygulanması kardiyak iskemi reperfüzyon sonrası azalan XIAP seviyesini aşırı artırmış olabilir.

Bcl2 ailesi proteinleri, apoptozun güçlü düzenleyicileridir (31). Mitokondriyal regülatör Bcl2, miyokardiyal apoptozda sitokrom-c salınımını bloke ederek ve kaspaz aktivitesini azaltarak antiapoptotik etki gösterir (9). Bax geni, Bcl2 ailesinde hücre ölümünü teşvik eden bir üyedir (32). Yapılan bir çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, I/R grubunda Bcl-2/Bax oranı anlamlı olarak azalmıştır (11). Bcl-2/Bax oranının artması, mitokondriye Bax translokasyonunu inhibe eder, böylece apoptozu suprese eder. Buna karşın azalmış Bcl-2 (Bcl-xL)/Bax oranı sitokrom-c salınımını ve ardından kaspaz-3-aracılı apoptozisi başlatır (19). MI geçiren mürin modelinde melatonin uygulamasıyla, Bcl2 ekspresyonu artmış ve Bax ekspresyonu azalmıştır (33). Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda miyokardiyal I/R hasarında, melatonin tedavisinin Bcl2 ekspresyonlarını arttırdığı ve Bax ekspresyonlarını azalttığı gösterilmiştir (34, 35). Yaşlı sıçanlarda yapılan bir çalışmada melatonin uygulaması, kardiyak dokudaki Bax mRNA ekspresyonunu anlamlı olarak azaltmıştır (36). Benzer şekilde, çalışmamızda I/R grubu ile karşılaştırıldığında melatonin uygulaması ile Bcl2I1 düzeyleri arttı ve Bax düzeyleri ise anlamlı olarak azaldı.

Oksidatif stres, kardiyovasküler hastalıkların patojenezinde önemli rol oynamaktadır (37). Oksidatif stresin bir belirteci olan MDA, çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile üretilir (38). Yapılan bir çalışmada melatonin uygulamasının I/R hasarında MDA seviyesini anlamlı olarak azalttığı ve GSH seviyesini arttırdığı rapor edilmiştir (13). Başka bir çalışmada, iskemi öncesi uygulanan melatoninin ventriküler taşikardiye ve fibrilasyonu baskıladığı, I/R sırasında O₂ üretimini ve MPO aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (39). Benzer şekilde, kardiyotoksik doksorubisin uygulaması yapılan pinealektomili sıçanlarda melatonin uygulamasıyla MDA seviyeleri anlamlı derecede azalmıştır (27). Çalışmamızda da benzer şekilde, I/R ile artan MDA düzeyi, melatonin tedavisi ile anlamlı şekilde azaldı.

Sonuç

Proapoptotik Bax ve antiapoptotik XIAP ve Bcl2I1 genleri, miyokardiyal I/R patolojisinde sinyal yollarının

da yer alabilir ve melatoninin koruyucu rolünde antiapoptotik aktivitesinin payı olabilir. Yaşlanma ve kardiyak hastalıklar gibi endojen melatonin seviyesinin

düşüğü durumlarda profilaktik melatonin uygulanması kalp koruyucu etki gösterebilir. Bu çalışma TÜBİTAK (115S323) numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Verma S, Fedak PWM, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A, vd. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation*. 21 Mayıs 2002;105(20):2332-6.
2. Health Organization (WHO). The top ten causes of death. Factsheet No 310/ 2008.
3. Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2016. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=24572>.
4. Orhan G, Biçer Y, Aka SA, Sargin M, Simşek S, Senay S, vd. Coronary artery bypass graft operations can be performed safely in obese patients. *Eur J Cardiothorac Surg*. Şubat 2004;25(2):212-7.
5. Wu M-Y, Yiang G-T, Liao W-T, Tsai AP-Y, Cheng Y-L, Cheng P-W, vd. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;46(4):1650-67.
6. Jiki Z, Lecour S, Nduhirabandi F. Cardiovascular Benefits of Dietary Melatonin: A Myth or a Reality? *Frontiers in Physiology* [Internet]. 17 Mayıs 2018 [a.yer 25 Şubat 2019];9. Erişim adresi: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.00528/full>
7. Reiter RJ. Melatonin, active oxygen species and neurological damage. *Drug News Perspect*. Haziran 1998;11(5):291-6.
8. Badalzadeh R, Mokhtari B, Yavari R. Contribution of apoptosis in myocardial reperfusion injury and loss of cardioprotection in diabetes mellitus. *J Physiol Sci*. Mayıs 2015;65(3):201-15.
9. D'Amelio M, Sheng M, Cecconi F. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends Neurosci*. Kasım 2012;35(11):700-9.
10. Kim S-J, Kuklov A, Crystal GJ. In vivo gene delivery of XIAP protects against myocardial apoptosis and infarction following ischemia/reperfusion in conscious rabbits. *Life Sci*. 28 Mart 2011;88(13-14):572-7.
11. Li J, Hu H-P, Li Y, Shao W, Zhang J-Z, Wang L-M. Influences of remifentanyl on myocardial ischemia-reperfusion injury and the expressions of Bax and Bcl-2 in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. Aralık 2018;22(24):8951-60.
12. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8.
13. 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: 491-5.
14. Kaneko S, Okumura K, Numaguchi Y et al. Melatonin scavenges hydroxyl radical and protects isolated rat hearts from ischemic reperfusion injury. *Life Sci* 2000; 67: 101-12.
15. Vazan R, Pancza D, Béder I, Styk J. Ischemia-reperfusion injury--antiarrhythmic effect of melatonin associated with reduced recovering of contractility. *Gen Physiol Biophys* 2005; 24: 355-9.
16. Vanacek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 1998; 78: 687-721.
17. Sokullu O, Sanioglu S, Kurç E et al. Does the circadian rhythm of melatonin affect ischemia-reperfusion injury after coronary artery bypass grafting? *Heart Surg Forum* 2009; 12: 95-9.
18. Liu L-F, Qin Q, Qian Z-H et al. Protective effects of melatonin on ischemia-reperfusion induced myocardial damage and hemodynamic recovery in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18: 3681-6.

19. Şehirli AÖ, Koyun D, Tetik Ş et al. Melatonin protects against ischemic heart failure in rats. *J Pineal Res* 2013; 55: 138-48.
20. Meki AM, Abdel-Ghaffar SKH, El-Gibaly I. Aflatoxin B1 induces apoptosis in rat liver: protective effect of melatonin. *Neuro endocrinology letters* 2001; 22: 417-26.
21. Dobsak P, Siegelova J, Eicher JC et al. Melatonin protects against ischemia-reperfusion injury and inhibits apoptosis in isolated working rat heart. *Pathophysiology* 2003; 9: 179-87.
22. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.
23. Russell JC, Whiting H, Szflita N, Hossain MA. Nuclear translocation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) determines cell fate after hypoxia ischemia in neonatal brain. *J Neurochem* 2008; 106: 1357-70.
24. Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci* 2010; 123: 3209-14.
25. Yuan H, Yan B, Wang HH, Hua S, Hu A. Nitric oxide preserves XIAP and reduces hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocytes apoptosis via ERK1/2 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 421: 134-9.
26. Zhang B, Rong R, Li H et al. Heat shock protein 72 suppresses apoptosis by increasing the stability of X-linked inhibitor of apoptosis protein in renal ischemia/reperfusion injury. *Mol Med Rep* 2015; 11: 1793-9.
27. Renwick J, Narang MA, Coupland SG et al. XIAP-mediated neuroprotection in retinal ischemia. *Gene Ther* 2006; 13: 339-47.
28. Kireev RA, Vara E, Tresguerres Ja F. Growth hormone and melatonin prevent age-related alteration in apoptosis processes in the dentate gyrus of male rats. *Biogerontology* 2013; 14: 431-42.
29. Pang Y, Zhao S, Sun Y et al. Protective effects of melatonin on the in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Anim Sci J* 2018; 89: 648-60.
30. Zeng C, Jiang W, Zheng R, He C, Li J, Xing J. Cardioprotection of tilianin ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury: Role of the apoptotic signaling pathway. *PLoS ONE* 2018; 13: e0193845.
31. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-19.
32. Wei MC, Zong WX, Cheng EH et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292: 727-30.
33. Han D, Huang W, Li X et al. Melatonin facilitates adipose-derived mesenchymal stem cells to repair the murine infarcted heart via the SIRT1 signaling pathway. *J Pineal Res* 2016; 60: 178-92.
34. Yu L, Liang H, Lu Z et al. Membrane receptor-dependent Notch1/Hes1 activation by melatonin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury: in vivo and in vitro studies. *J Pineal Res* 2015; 59: 420-33.
35. Yang Y, Duan W, Jin Z et al. JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Pineal Res*. Ekim 2013;55(3):275-86.
36. Sahach VF, Rudyk OV, Vavilova HL, Kotsiuruba AV, Tkachenko IP. Melatonin recovers ischemic tolerance and decreases the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore opening in the heart of aging rats. *Fiziol Zh* 2006; 52: 3-14.
37. Ho E, Karimi Galougahi K, Liu C-C, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol* 2013; 1: 483-91.
38. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1685-96.
39. Zhu S-G, Xi L, Kukreja RC. Type 2 diabetic obese db/db mice are refractory to myocardial ischaemic post-conditioning in vivo: potential role for Hsp20, F1-ATPase δ and Echs1. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 950-8.

Gülnur ASLAN	0000-0003-1302-4565
Hüseyin Fatih GÜL	0000-0002-9828-1298
Engin ŞAHNA	0000-0001-8311-9055
Ebru ÖNALAN	0000-0001-9968-8201