

# Melatoninin Deneysel Miyokart Infarktüsünde Serum Paraoksonaz ve Laktonaza Etkisi

## *Melatonin Effects on Serum Paraoxonase and Lactonase in Experimental Myocardial Infarction*

Eray Özgün\* Gülben Sayılan Özgün\* Ufuk Usta\*\*  
Sevqi Eskiocak\* Selma Süer Gökmen\*

\* Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, Edirne, Türkiye

\*\* Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji AD, Edirne, Türkiye

**Başvuru Tarihi:** 20 Şubat 2018

**Kabul Tarihi:** 23 Mart 2018

### ÖZET

**Amaç:** Melatoninin isoproterenol ile oluşturulan miyokart infarktüsünde paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerine etkisini incelemektir.

**Materyal ve Metod:** Sıçanlar kontrol, melatonin, ISO ve ISO+melatonin olmak üzere dört gruba ayrıldı. Melatonin ve ISO gruplarına 7 gün boyunca intraperitoneal olarak melatonin enjekte edildi. ISO ve ISO+melatonin gruplarına 6. ve 7. günlerde intraperitoneal olarak isoproterenol enjekte edildi. Her gruptan birer sıçan son isoproterenol enjeksiyonundan sonra 15 gün daha yaşatılarak kalp dokuları histopatolojik olarak incelendi. Diğer tüm sıçanlar 8. günde sakrifiye edilerek serum troponin I ve malondialdehit düzeyleri, total oksidan ve antioksidan durum, paraoksonaz ve laktonaz aktiviteleri ölçüldü. Oksidatif stres indeksi formülden hesaplandı.

**Bulgular:** Deneysel miyokart infarktüsü serum troponin I düzeylerinin artışı ile kanıtlandı, fibrotik alanların varlığını gösteren histopatolojik inceleme ile de desteklendi. İsooproterenol ile oluşturulan miyokart infarktüsünde, malondialdehit, total oksidan durum ve oksidatif stres indeksi anlamlı olarak artarken, total antioksidan durum, paraoksonaz ve laktonaz aktiviteleri anlamlı olarak azaldı. Melatonin, isoproterenol ile oluşturulan miyokart infarktüsünde, serum malondialdehit, total oksidan durum ve oksidatif stres indeksini anlamlı olarak azalttı ve paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerini anlamlı olarak artırdı. Sağlıklı sıçanlarda melatonin serum laktonaz aktivitesini artırdı.

**Sonuç:** Melatonin, isoproterenol ile oluşturulan miyokart infarktüsünde serum paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerinde gözlenen azalmayı önler.

**Anahtar kelimeler:** Melatonin; miyokardiyal infarktüs; paraoksonaz; laktonaz; oksidatif stres; lipid peroksidasyonu.

**Yazışma adresi:** Selma Süer Gökmen

**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5701-4962>

Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD Edirne, Türkiye

e-mail: selmasuer@hotmail.com

**ABSTRACT**

**Purpose:** To investigate the effects of melatonin on serum paraoxonase and lactonase activities in isoproterenol-induced myocardial infarction.

**Materials and Methods:** Rats were divided into four groups as control, melatonin, ISO and ISO+melatonin. Melatonin was injected intraperitoneally for 7 days to melatonin and ISO+melatonin groups. On 6th and 7th days, isoproterenol was injected intraperitoneally to ISO and ISO+melatonin groups. One rat for each group was kept alive for 15 days after the last ISO injection and their hearts were investigated histopathologically. On 8th day, all other rats were sacrificed and serum troponin I and malondialdehyde levels, total oxidant and antioxidant status, paraoxonase and lactonase activities were measured. Oxidative stress index was calculated from the formula.

**Results:** Experimental myocardial infarction was confirmed by serum TnI elevation and was supported with histopatologic examination which shows existence of fibrotic areas. Serum malondialdehyde, total oxidant status and oxidative stress index were significantly increased whereas total antioxidant status, paraoxonase and lactonase activities were significantly decreased in isoproterenol-induced myocardial infarction. Melatonin significantly decreased malondialdehyde, total oxidant status and oxidative stress index and increased paraoxonase and lactonase activities in isoproterenol-induced myocardial infarction. Melatonin increased serum lactonase activity in healthy rats.

**Conclusion:** Melatonin prevents a decrease in serum paraoxonase and lactonase activities seen in ISO-induced myocardial infarction.

**Key words:** Melatonin; myocardial infarction; paraoxonase; lactonase; oxidative stress; lipid peroxidation.

**GİRİŞ**

Paraoksonaz (PON) enzim ailesinin PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç üyesi bulunmaktadır. Bu enzimler antioksidan enzimler olup en çok karaciğerde sentezlenirler. PON1 ve PON3; yüksek dansiteli lipoproteine bağlı olarak dolaşımda bulunurken, PON2 ise hücre içi enzimdir (1). PON enzimlerinin en bilinen aktivitesi; enzim ailesine adını veren paraoksonaz aktivitesi olmakla birlikte tüm PON enzimlerinin esas aktivitelerinin laktonaz olduğu gösterilmiştir. Laktonaz aktivitesi ile lipofilik laktonları hidroliz edebilirler ve lipoproteinlerdeki ve hücredeki okside lipidleri indirgeyebilirler (2). PON1 dışındaki PON enzimlerinin, paraoksonaz aktivitesi yoktur. Bu nedenle serum paraoksonaz aktivitesi sadece PON1 enziminin göstergesi iken serum laktonaz aktivitesi serumdaki tüm paraoksonaz (PON1 ve PON3) enzimlerinden kaynaklanır (1). Literatürde PON1 ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, PON3 enzimi ve laktonaz aktivitesi ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Daha önceki çalışmalarımız, aynı gen ailesinden olmalarına rağmen, PON1 ve PON3'ün protein düzeylerinin ve mRNA ekspresyonlarının farklı moleküller tarafından farklı biçimde etkilendiklerini gösterdi (3,4). Bu bulgu,

paraoksonaz aktivitesinin sadece PON1'de bulunması nedeniyle önem arz etmektedir. Bu nedenle paraoksonaz aktivitesinin yanı sıra laktonaz aktivitesinin de ölçülmesi PON3 enzimi hakkında bilgi verebilir.

Miyokart infarktüsülü bireylerde paraoksonaz aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (5). Akut koroner sendromlu hastalarda koroner arter hastalığının şiddeti ile paraoksonaz aktiviteleri arasında negatif yönlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir (6). Koroner arter hastalığı olan bireylere ve sağlıklılara göre, akut miyokart infarktüsü geçiren bireylerde serum PON aktivitesinin daha düşük olduğu da gösterilmiştir (7). Miyokart infarktüsülü hastalarda gözlenen serum paraoksonaz aktivitesindeki azalmanın infarktüstün önce ateroskleroza bağlı olarak meydana gelmiş olabileceği ya da miyokart infarktüsüne akut bir reaksiyon olarak ortaya çıkmış olabileceği ileri sürülmüştür (5). Miyokart infarktüsünün akut döneminde serum paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerindeki değişimin daha sağlıklı incelenbilmesi için miyokart infarktüsüne zemin oluşturan aterosklerozdan kaynaklanabilecek olası bir enzim aktivitesi düşüklüğünü bertaraf etmek gereklidir.

Sentetik bir katekolamin olan isoproterenol (ISO), sıçanlarda deneysel miyokart infarktüsünü

tüsü oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek doz ISO ile oluşturulan deneysel miyokart infarktüsünde kalp dokusu, miyokart infarktüsü geçiren hastaların kalp dokuları ile benzer histopatolojik değişikliklere sahiptir (8,9). ISO ile uyarılan deneysel miyokart infarktüsünde paraoksonaz aktivitesinin azaldığı gösterilmiş olmasına rağmen (10), laktonaz aktivitesinin nasıl değiştiği bilinmemektedir.

Lipid peroksidasyonu son ürünü olan malondialdehit (MDA) (12), total oksidan durum (TOS) (13) ve total antioksidan durum (TAS) (14) oksidatif stresin değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerdir.

Melatonin esas olarak pineal bez tarafından triptofandan sentezlenen ve karanlıkta salgılanan endojen bir hormondur. Vücutta melatoninin önemli fizyolojik rolleri vardır ve antioksidan özellikler gösterir (15). Melatonin tedavisinin kardiyak iskemi reperfüzyonunda koruyucu bir role sahip olduğu gösterilmiştir (16,17). Melatoninin kardiyoprotektif rolünde hücrel oksidatif stres, otofaji, trombosit agregasyonu, endoplazmik retikulum stresi ve kalsiyum dengesizliğinin önlenmesi gibi etki mekanizmalarının rolü olabileceği bildirilmesine rağmen (16), paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerine etkisi bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı; ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde melatoninin paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerine etkisini incelemektir.

## **MATERYAL VE METOD**

### **Kimyasallar**

Tüm kimyasallar uygun analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, ABD)'dan veya Merck (Darmstadt, Almanya)'den temin edilmiştir.

### **Deneyel Protokol**

Bu çalışma için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul onayı alındı (Tarih: 05.01. 2011, no: TÜHDYK-2011/06). Çalışmada Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edilen erişkin erkek Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar bazal diyet

ile beslendi ve  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  oda ısısı, %55 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ritim sağlandı. 44 adet sıçan; kontrol, melatonin, ISO ve ISO+melatonin grupları olmak üzere rastgele ve eşit sayıda dört gruba ayrıldı. Grupların vücut ağırlıkları (ortalama $\pm$ standart sapma) kontrol grubunda  $279.90\pm 19.14$  g, melatonin grubunda  $277.70\pm 12.28$  g, ISO grubunda  $278.56\pm 10.22$  g ve ISO+melatonin grubunda  $278.43\pm 9.14$  g olup, istatistiksel olarak farksızdı.

Melatonin her uygulama öncesi taze olarak hazırlandı. Melatonin etanolde çözüldü, son etanol konsantrasyonu %4 olacak şekilde steril serum fizyolojik ile dilüe edildi ve 7 gün boyunca 10 mg/kg/gün dozunda melatonin ve ISO+melatonin gruplarına saat 14:00'da intraperitoneal olarak uygulandı (18,19). Aynı anda kontrol ve ISO gruplarına ise çözücü (serum fizyolojikte %4 etanol) uygulandı. 6. ve 7. günlerde, steril serum fizyolojikte çözülen ISO, 150 mg/kg/gün dozunda (18,19) ISO ve ISO+melatonin gruplarına saat 15:00'da intraperitoneal olarak uygulanırken, aynı anda diğer gruplara steril serum fizyolojik uygulandı. İlk ISO uygulamasından sonra ISO grubundan bir, ISO+melatonin grubundan ise üç sıçan öldü.

Her gruptan rastgele seçilen birer sıçan, son ISO uygulamasından 15 gün sonra sakrifiye edilerek kalp dokuları histopatolojik olarak incelendi (20,21). Diğer tüm sıçanlar ise son ISO ya da steril serum fizyolojik uygulamasından sonra ksilazin (5 mg/kg) ve ketamin (50 mg/kg) anestezisi altında kan örnekleri alınarak sakrifiye edildi. Kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek ayrılan serumlar, biyokimyasal analizler için  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### **Serum Troponin I (TnI) ölçümü**

TnI düzeyleri, ticari High Sensitivity Rat Cardiac TnI Elisa Kiti (Life Diagnostic, ABD) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar ng/mL olarak ifade edildi.

### **Histopatolojik inceleme**

Sıçanlardan alınan kalpler tamponlu formaldehit içinde yaklaşık 24 saat tespit edildikten sonra, tüm kalp duvarları görülebilecek şekil-

de horizontal sirküler örnekler alındı. Gece boyu alkol takibine alınan örnekler parafine gömülmesinin ardından alınan 5 mikron kalınlığındaki kesitler rutin hematoksilen-eozin boyası ve Masson's trichrome boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

### Serum MDA ölçümü

Serum MDA düzeyleri Ohkawa metoduna (22) göre ölçüldü. Sonuçlar nmol/mL olarak ifade edildi.

### Serum TOS ve TAS ölçümü ve oksidatif stres indeksinin hesaplanması

TOS ve TAS düzeyleri ticari kitler (RelAssay Diagnostic, Türkiye) kullanılarak ölçüldü ve sonuçlar sırasıyla  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Eq/L ve mmol Trolox Eq/L olarak ifade edildi. Oksidatif stres indeksi (23), TAS birimi  $\mu\text{mol Trolox Eq/L}$ 'ye çevrilerek aşağıdaki formül ile hesaplandı:

Oksidatif stres indeksi =  $\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}) \times 100 / \text{TAS } (\mu\text{mol Trolox Eq/L})$

### Serum paraoksonaz ve laktonaz aktivitesi ölçümü

Serum paraoksonaz aktivitesi Gan ve ark. (24)'nin metodu ile substrat olarak paraokson kullanılarak, laktonaz aktivitesi ise Dragancov ve ark. (25)'nin metodu ile dihidrokumarin kullanılarak ölçüldü. Paraoksonaz aktivitesi, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  ve 1 mM paraokson çözeltisi içeren Tris-HCl (50mM, pH:8) kullanılarak 25 °C'de 412 nm'de kinetik olarak ölçüldü. Oluşan p-nitrofenol miktarının hesaplanması

için molar ekstinksiyon katsayısı olarak  $17000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  kullanıldı. Laktonaz aktivitesi, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  ve sırasıyla 1 mM fenilasetat ve dihidrokumarin çözeltisi içeren Tris-HCl (50mM, pH:8) kullanılarak 25 °C'de 270 nm'de kinetik olarak ölçüldü. Laktonaz enzim aktivitelerinin hesaplanması için molar ekstinksiyon katsayısı olarak  $1295 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  kullanıldı. Sonuçlar U/L olarak ifade edildi. Enzim ünitesi, dakikada paraoksonaz aktivitesi için 1  $\mu\text{mol}$ , laktonaz aktivitesi için ise 1 mmol ürün oluşturan enzim miktarı olarak kabul edildi (26).

### İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz, mini-tab release 13 (Mini-tab Inc, ABD) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Her grupta verilerin parametrik varsayımları yerine getirip getirmediğini inceleyebilmek için normal dağılıma uygunluk ve varyans homojenliği testleri yapıldı. Parametrik veriler için Tek Yönlü Varyans Analizi ve gruplar arası karşılaştırma için Tukey ve Tamhane testleri; nonparametrik veriler için Kruskal-Wallis ve gruplar arası karşılaştırma için Mann-Whitney U testleri kullanıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi ve  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

Grupların biyokimyasal parametreleri Tablo 1'de, kontrol grubuna göre yüzdeleri ise Şekil 1'de gösterilmiştir. Histopatolojik incelemeler Şekil 2'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Grupların biyokimyasal parametreleri (Biochemical parameters of groups)

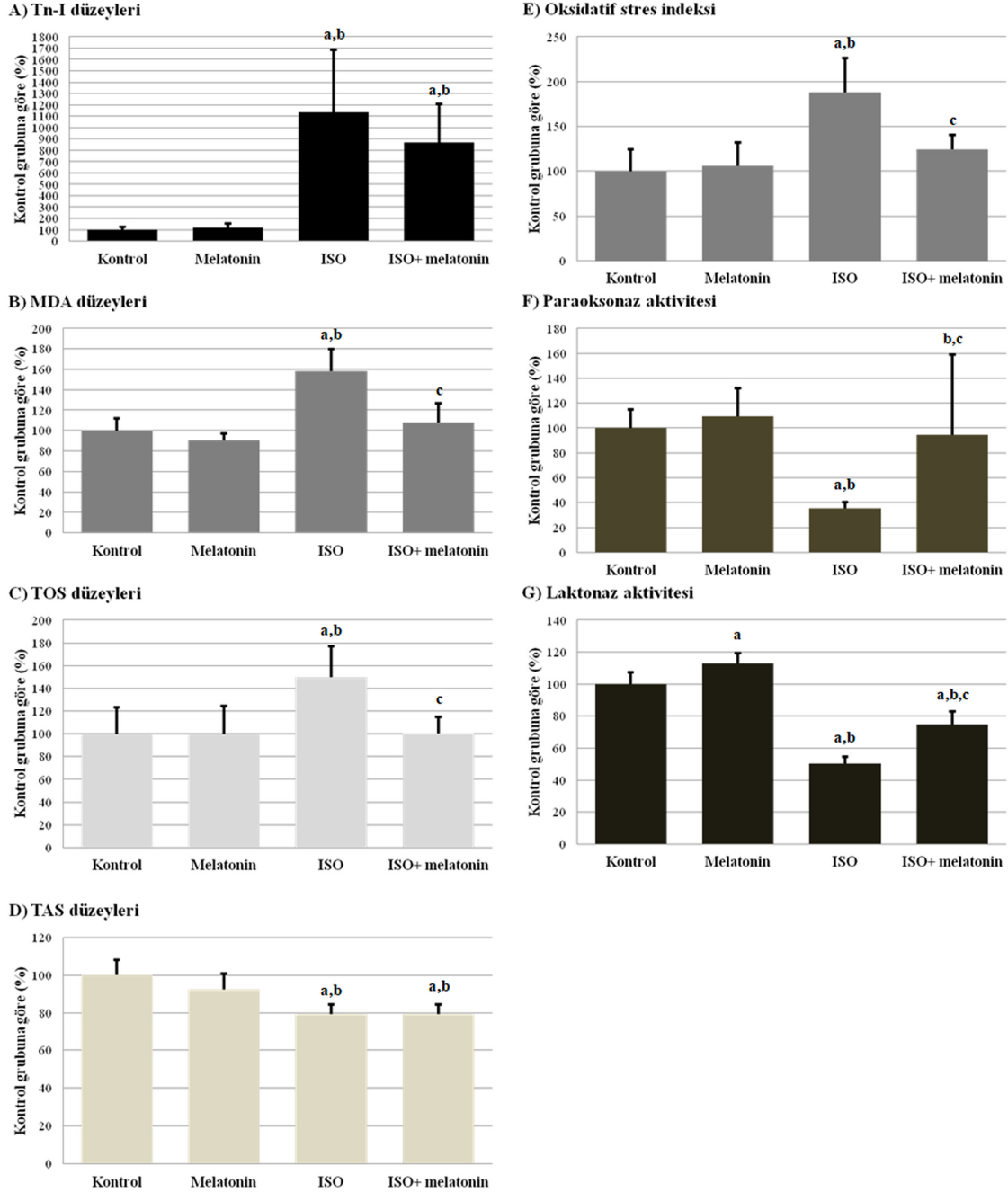
Parametre/Grup (n)	Kontrol (10)	Melatonin (10)	ISO (9)	ISO+melatonin (7)
Tnl (ng/mL)	0.50 $\pm$ 0.15	0.59 $\pm$ 0.18	5.67 $\pm$ 2.76 <sup>a b</sup>	4.33 $\pm$ 1.69 <sup>a b</sup>
MDA (nmol/mL)	3.49 $\pm$ 0.41	3.15 $\pm$ 0.25	5.53 $\pm$ 0.74 <sup>a b</sup>	3.76 $\pm$ 0.66 <sup>c</sup>
TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L)	8.70 $\pm$ 2.05	8.69 $\pm$ 2.14	13.02 $\pm$ 2.37 <sup>a b</sup>	8.72 $\pm$ 1.28 <sup>c</sup>
TAS (mmol Trolox Eq/L)	1.36 $\pm$ 0.11	1.26 $\pm$ 0.11	1.08 $\pm$ 0.07 <sup>a b</sup>	1.08 $\pm$ 0.06 <sup>a b</sup>
Oksidatif stres indeksi	0.65 $\pm$ 0.16	0.69 $\pm$ 0.17	1.22 $\pm$ 0.25 <sup>a b</sup>	0.81 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>
Paraoksonaz aktivitesi (U/L)	15.22 $\pm$ 2.28	16.67 $\pm$ 3.43	5.43 $\pm$ 0.69 <sup>a b</sup>	14.39 $\pm$ 9.78 <sup>b c</sup>
Laktonaz aktivitesi (U/L)	7.94 $\pm$ 0.58	8.95 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	4.00 $\pm$ 0.33 <sup>a b</sup>	5.95 $\pm$ 0.64 <sup>a b c</sup>

TAS ve MDA düzeyleri Tek Yönlü Varyans Analizi, diğer tüm parametreler Kruskal Wallis testi ile analiz edildi.

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ .

b: Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ .

c: ISO grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ .



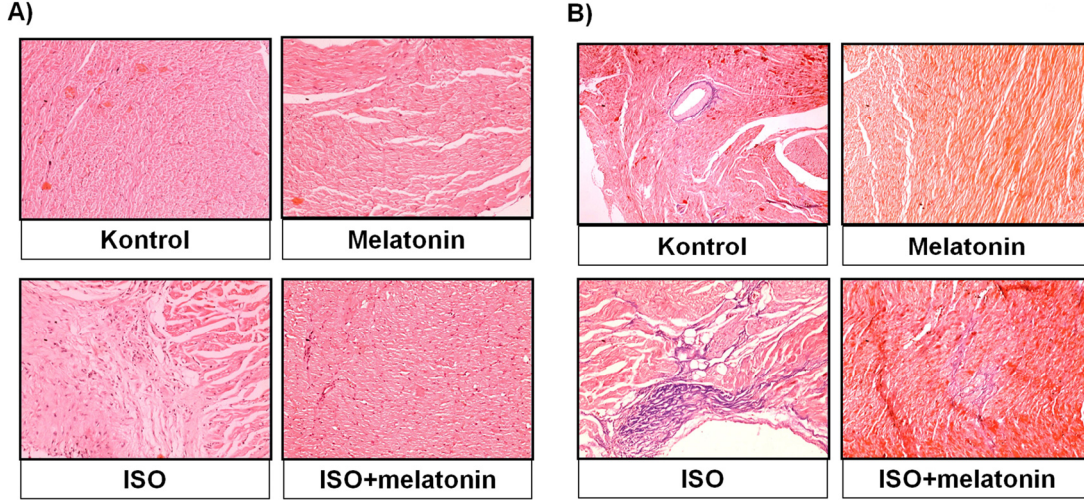
**Şekil 1.** Grupların biyokimyasal parametrelerinin kontrol grubuna göre yüzdeleri (Biochemical parameters of groups according to control group percentages)

Şekilde gruplara ait serum A) Tn-I , B) MDA, C) TOS ve D) TAS düzeyleri, E) Oksidatif stres indeksi, F) Paraoksonaz ve G) Laktonaz aktiviteleri görülmektedir. Her bir biyokimyasal parametre için, kontrol grubuna göre yüzde değerleri: (Grupun parametre ortalaması/Kontrol grubunun parametre ortalaması)\*100 formülü ile hesaplanmıştır. TAS ve MDA düzeyleri Tek Yönlü Varyans Analizi, diğer tüm parametreler Kruskal Wallis testi ile analiz edildi.

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ .

b: Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ .

c: ISO grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0.05$ .



**Şekil 2.** Kalp dokusu histopatolojik incelemeleri (Histopathological examinations of hearts)

Her gruptan birer adet sıçanın ISO uygulanmasından 15 gün sonra sakrifiye edilerek kalp dokuları histopatolojik olarak incelendi. **A)** Hematoksiyen-eosin ve **B)** Masson's trichrome ile boyama (100x büyütme). Kontrol grubundaki sıçanın ve melatonin grubundaki sıçanın kalp dokusunda düzenli miyokart kas lifleri görülürken, ISO grubundaki sıçan ve ISO+melatonin grubundaki sıçanda miyokart lifleri arasında fibrotik alanlar görüldü.

ISO uygulanan grupların serum TnI düzeyleri kontrol ve melatonin gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu (tümü için  $p < 0.05$ ). Kontrol grubundaki sıçana ve melatonin grubundaki sıçana ait kalp dokularında düzenli miyokart kas lifleri görülürken, ISO grubundaki sıçanın ve ISO+melatonin grubundaki sıçanın miyokart lifleri arasında fibrotik alanlar görüldü.

ISO uygulanması, sıçanların serum MDA ve TOS düzeyleri ve oksidatif stres indeksi anlamlı bir artışa, serum TAS düzeylerinde ise anlamlı bir azalmaya neden oldu (tümü için  $p < 0.05$ ). ISO uygulanan sıçanlara melatonin verilmesi ise serum MDA ve TOS düzeylerinde ve oksidatif stres indeksi artışını anlamlı olarak önledi (tümü için  $p < 0.05$ ), serum TAS düzeylerini etkilemedi.

ISO uygulanması, sıçanların serum paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerinde anlamlı bir azalmaya neden oldu (her ikisi için  $p < 0.05$ ). ISO uygulanan sıçanlara melatonin verilmesi ise serum paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerinde azalmayı anlamlı olarak önledi (her ikisi için  $p < 0.05$ ). Diğer yandan, sağlıklı sıçanlara melatonin verilmesi serum laktonaz aktivitesinde anlamlı bir artışa yol açtı ( $p < 0.05$ ).

## TARTIŞMA

Paraoksonaz enzimlerinin ateroskleroza ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu bir role sahip olduğu bilinmektedir (27). Koroner arter hastalığı olan bireylere ve sağlıklı bireylere göre, akut miyokart infarktüsü geçiren bireylerde serum PON aktivitesinin daha düşük olduğu ileri sürülmüştür (7). Serum paraoksonaz aktivitesindeki azalmada, infarktüse zemin oluşturan ateroskleroz rol oynayabileceği gibi miyokart infarktüsü esnasında ortaya çıkan akut reaksiyonların da rolü olabilir (5). Miyokart infarktüsünün, aterosklerotik koroner kalp hastalığı zemininde geliştiği göz önüne alındığında, akut miyokart infarktüsü geçiren bireylerin infarktüs geçirmeden önceki serum PON enzim aktivitelerinin sağlıklı kişiler ile aynı olamayacağı açıktır. ISO ile oluşturulan miyokart infarktüs modelinde serum paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerinin incelenmesi bu nedenle önem arz etmektedir.

ISO ile uyarılmış lezyon, miyokart nekrozu olarak tanımlanır ve insanlardaki hipoksik/iskemik kalp hastalığında görülen özellikleri gösterir (8,9). ISO ile oluşturulan nekrozda, siklik adenosin monofosfat ve hücre içi

kalsiyum artışı ile birlikte yüksek enerjili fosfatların tüketilmesi de önemli rol oynar (28,29). Ayrıca katekolaminlerin kolayca oksidasyona uğradığı ve bu oksidasyon ürünlerinin de hücre hasarına yol açtığı gösterilmiştir (30). ISO ile uyarılan miyokart nekrozunun patogeneğinde oksidatif stres önemli rol oynar (11). Artmış oksidatif stres, protein, lipid ve DNA gibi önemli biyolojik moleküllerin yapısında değişime yol açarak oksidatif hasara neden olur (31).

Karanlığa yanıt olarak pineal bez tarafından sentezlenen melatonin, antioksidan olarak vücutta önemli rol oynar (15). Azalmış melatonin sekresyonunun vücut kitle indeksi yüksek olan kadınlarda miyokart infarktüsü riskinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (32). Kardiyak iskemi reperfüzyonunda melatoninin çeşitli etki mekanizmaları üzerinden koruyucu bir rol oynadığı gösterilmiştir (16). Bununla birlikte melatoninin paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerine etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmada ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde melatoninin paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerine etkisini incelemek amaçlanmıştır.

ISO verilmesi, sıçanların serum TnI düzeylerinde anlamlı bir artışa neden oldu. Serum TnI düzeylerindeki artış, ISO ile oluşturulan deneysel miyokart infarktüsünü kanıtlamaktadır. İnfarktüsün 10. gününden sonra bağ dokusunun görülebildiği bilinmektedir (33). İnfarktüs varlığı, sıçan gruplarından rastgele seçilerek 15 gün yaşatılan sıçanlardan ISO verilenlerin kalp dokularındaki bağ doku oluşumu ile de desteklenmiştir.

Melatonin verilmesi serum TnI düzeylerini değiştirmedir. Çalışmamız, aort anevrizması cerrahisi sonrası artan serum TnI düzeylerinin melatonin tedavisi ile değişmediğini bildiren Küçükakın ve ark. (34) çalışmalarını desteklemektedir. Diğer yandan, Açıklık ve ark. (18) ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde melatoninin serum TnI düzeylerini anlamlı olarak azalttığını bildirmişlerdir.

Oksidatif stres ve antioksidan durumunun değerlendirilmesinde çeşitli belirteçler ve yöntemler kullanılmaktadır (31). Aynı ayrı

ölçümleri zaman alıcı ve masraflı olan bu belirteçlerin yerine son yıllarda, oksidatif durumu ortaya koyan TOS düzeyi (13), antioksidan durumu ortaya koyan TAS düzeyi (14) ölçümü ve bunlardan hesaplanan oksidatif stres indeksi sıklıkla kullanılmaktadır (23).

ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde, kardiyak TOS düzeylerinin arttığı oysa TAS düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir (35,36). Bu çalışmaları destekler şekilde, çalışmamız, ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde, serumda TOS düzeylerinin ve oksidatif stres indeksinin arttığını, TAS düzeylerinin ise azaldığını ilk kez gösterdi. Çalışmamızda ayrıca lipid peroksidasyonun göstergesi olan MDA düzeylerinin ISO ile oluşturulan miyokart infarktüslü sıçanların serumunda arttığını gösterdik.

ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde serum TOS ve MDA düzeylerinin ve oksidatif stres indeksinin arttığını, serum TAS düzeylerinin azaldığını gösteren bulgularımız, ISO ile uyarılan miyokart nekrozunun patogeneğinde oksidatif stresin önemli rol oynadığını (11) ve ISO'nun lipid peroksidasyonunu artırdığını (10,37) ileri süren çalışmaları desteklemektedir.

ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde, melatoninin, kalp dokusundaki lipid peroksidasyonuna etkisi ile ilgili çalışmalar bulunmasına rağmen (38,39), literatürde serum oksidatif stres parametreleri üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlayamadık. Bu çalışmada melatoninin, ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde serum MDA ve TOS düzeyleri ve oksidatif stres indeksinde gözlenen artışı önlediğini, ancak serum TAS düzeylerini etkilemediğini gösterdik. Bu bulgular, ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde melatoninin antioksidan rolünde, antioksidan savunmayı destekleme etkisinden ziyade radikal süpürücü etkisinin daha baskın olduğuna işaret etmektedir.

Laktonların doğal substrat olmaları ve yapısal olarak çoklu doymamış yağ asitlerinin okside metabolitlerine benzemesi nedeniyle paraoksonaz enzimlerinin aslında birer laktonaz

olduğu bildirilmiştir (2). Tüm PON enzimleri laktonaz aktivitesine sahiptir ve serumda laktonaz aktivitesinin esas kaynağı PON1 ve PON3'tür (1).

Çalışmamız, aterosklerozdan bağımsız bir miyokart infarktüs modelinde serumda hem paraoksonaz hem de laktonaz aktivitelerinin azaldığını kanıtladı. ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde serum paraoksonaz aktivitesinin azaldığı daha önceki çalışmalarla da gösterilmiştir (10,40). Martinelli ve ark. (41) tarafından, koroner arter hastalığı olan bireylerde ölçülen iki farklı laktonaz aktivitesinden, serum tiyobutil butirolaktonaz aktivitesinin değişmediği, 7-O-dietilfosforil-3-siyano-4-metil-7-hidroksikumarinaz aktivitesinin ise azaldığı gösterilmiş olmasına rağmen, aterosklerozdan bağımsız bir miyokart infarktüs modelinde serum laktonaz aktivitesinin azaldığı çalışmamız ile ilk kez gösterilmiş oldu.

Aterosklerozdan bağımsız bir miyokart infarktüs modelinde serum paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerinin azaldığını gösteren bulgumuz, miyokart infarktüslü bireylerde gözlenen serum paraoksonaz aktivitesindeki azalmadan, infarktüse zemin hazırlayan aterosklerozun yanısıra miyokart infarktüsünde ortaya çıkan akut reaksiyonların da sorumlu olabileceğine işaret etmektedir.

Miyokart infarktüsü sırasındaki akut reaksiyonların aterosklerozu hızlandığı (42) ve miyokart infarktüslü bireylerde re-infarktüs riskinde bir artış olduğu (43) bilinmektedir. İnfarktüsün akut döneminde serum paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerinin azalması, miyokart infarktüslü bireylerde hızlanmış ateroskleroz ve artmış re-infarktüs riskinde rol oynayabilir.

Laktonaz aktivitesinin hem PON1 hem de PON3 enzimlerinin aktivitesi olması nedeniyle (2), aterosklerozdan bağımsız bir miyokart infarktüs modelinde paraoksonaz aktivitesinin yanısıra serum laktonaz aktivitesinin de azaldığını gösteren bulgumuz aynı zamanda, miyokart infarktüsünde ortaya çıkan akut reaksiyonlardan PON1 enzimi ile birlikte PON3 enziminin de etkilenmiş olabi-

leceğine işaret eden önemli bir bulgudur. Akut miyokart infarktüsünde özellikle PON3 enzimidaki değişimi inceleyecek yeni çalışmalar, bu konu ile ilgili daha aydınlatıcı bir bilgi ortaya koyacaktır.

PON1'in tampon etkisine sahip olduğu ve oksidatif stress ile inaktive olduğu bilinmektedir (27). Dolayısıyla ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde serum paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerinde gözlenen azalmada artmış oksidatif stresin rolü olabileceği açıktır.

Çalışmamızda melatonin verilmesi, ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde serum paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerindeki azalmayı anlamlı olarak önledi. ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde serum paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerinde gözlenen azalmanın melatonin ile önlenmesinde; melatoninin artmış oksidatif stres ile mücadelesinin ve buna bağlı enzim inaktivasyonunu önlenmesinin rolü olabilir. Diğer yandan melatonin, paraoksonaz ve laktonaz enzimlerinin aktivitesini, gen ekspresyonunu düzenlenmesi aracılığı ile de etkilemiş olabilir zira antioksidan etkiye sahip kafein ve lipoik asidin, PON1 ve PON3 protein düzeylerini ve mRNA ekspresyonlarını etkileyebildikleri gösterilmiştir (3,4).

Çalışmamızda melatonin, sağlıklı sıçanların serum laktonaz aktivitesinde anlamlı bir artışa neden olurken, serum paraoksonaz aktivitesini etkilemedi. Bu bulgu, melatoninin, sağlıklılarda, PON1 enzimini değil, özellikle PON3 enzimini etkilediğine işaret eden önemli bir bulgudur çünkü paraoksonaz aktivitesi sadece PON1 enziminin aktivitesi iken, laktonaz aktivitesi hem PON1 hem de PON3 enzimlerinin aktivitesidir. Bu bulgu, aynı antioksidan molekülün, PON1 ve PON3 protein ve/veya gen ekspresyonlarını farklı şekilde etkilediğini gösteren çalışmalarımızı da (3,4) desteklemektedir. Paraoksonaz aktivitesini değiştirmeksizin laktonaz aktivitesinde bir artışa neden olması, aynı zamanda, melatoninin, oksidan/antioksidan dengesinin bozulmadığı, dolayısıyla enzimin oksidatif partiküllerle mücadele etmesine gerek olmadığı normal koşullarda etki mekanizmasının,



özellikle PON3 sentezini düzenleme ile ilişkili olabileceğinin de bir göstergesidir.

Bu bulgular ışığında, ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde özellikle serum laktonaz aktivitesinde gözlediğimiz azalmanın melatonin verilmesi ile önlenmesinde, melatoninin antioksidan etkisinin yanısıra PON3 sentezini uyarmasının da rolü olabileceğini söylemek mümkündür. Bu bulgularımız aynı zamanda PON1 ve PON3'ün ya da paraoksonaz ve laktonazın birlikte ölçümünün daha değerli olabileceğini de ortaya koymaktadır.

#### KAYNAKLAR

1. She ZG, Chen HZ, Yan Y, Li H, Liu, DP. The human paraoxonase gene cluster as a target in the treatment of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2012;16(6):597-632.
2. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res* 2005;46(6):1239-47.
3. Ozgun E, Sayilan Ozgun G, Tabakcioglu K, Suer Gokmen S, Sut N, Eskiocak S. Effect of lipoic acid on paraoxonase-1 and paraoxonase-3 protein levels, mRNA expression and arylesterase activity in liver hepatoma cells. *Gen Physiol Biophys* 2017;36(4):465-70.
4. Sayilan Özgün G, Özgün E, Tabakçioğlu K, Sür Gökmen S, Eskiocak S, Çakır E. Caffeine Increases Apolipoprotein A-1 and Paraoxonase-1 but not Paraoxonase-3 Protein Levels in Human-Derived Liver (HepG2) Cells. *Balkan Med J* 2017;34(6):534-39.
5. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(2):330-5.
6. Şentürk T, Sarandöl E, Güllülü S, Erdiñç S, Özdemir B, Baran I, Aydınlar A. Association between paraoxonase 1 activity and severity of coronary artery disease in patients with acute coronary syndromes. *Acta Cardiol* 2008;63(3):361-67.
7. Maturu VN, Gupta N, Singh G, Gill K, Sharma YP, Singh S. Serum Paraoxonase (PON1) Activity in North-West Indian Punjabi's with Acute Myocardial Infarction. *Indian J Clin Biochem* 2013;28(3):248-54.
8. Rona G. Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17(4):291-306.
9. Ou L, Li W, Liu Y, Zhang Y, Jie S, Kong D, Steinhoff G, et al. Animal models of cardiac disease and stem cell therapy. *Open Cardiovasc Med J* 2010;4:231-9.

Sonuç olarak, çalışmamız, ISO ile oluşturulan miyokart infarktüsünde serum paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerinde bir azalmanın olduğunu, melatonin verilmesinin ise bu azalmayı önlediğini gösterdi. Melatonin tedavisinin miyokart infarktüsünde paraoksonaz ve laktonaz aktivitelerinin azalmasını önleyerek faydalı olabileceğini söyleyebiliriz.

#### Bilgi ve Teşekkür

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (TÜBAP 2011/120).

10. Hussain Shaik A, Rasool SN, Kareem MA, Krushna GS, Akhtar PM, Devi KL. Maslinic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in albino Wistar rats. *J Med Food* 2012;15(8):741-6.
11. Wong ZW, Thanikachalam PV, Ramamurthy S. Molecular understanding of the protective role of natural products on isoproterenol-induced myocardial infarction: A review. *Biomed Pharmacother* 2017;94:1145-66.
12. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15(4):316-28.
13. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38(12):1103-11.
14. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004;37(4):277-85.
15. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005;27(2):101-10.
16. Zhou H, Ma Q, Zhu P, Ren J, Reiter RJ, Chen Y. Protective role of melatonin in cardiac ischemia reperfusion injury: from pathogenesis to targeted therapy. *J Pineal Res* 2018. doi: 10.1111/jpi.12471. (Epub ahead of print)
17. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Avanzas P. The role of melatonin in acute myocardial infarction. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012;17:2433-41.
18. Acikel M, Buyukokuroglu ME, Aksoy H, Erdogan F, Erol MK. Protective effects of melatonin against myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *J Pineal Res* 2003;35(2):75-9.
19. Patel V, Upaganlawar A, Zalawadia R, Balaraman R. Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: a biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation. *Eur J Pharmacol* 2010;644(1-3):160-8.

20. Kazezoglu C, Usta U, Gökmen SS. Deneysel miyokart infarktüsünde total ve lipide bağlı sialik asid düzeyleri. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2009;7(1):7-15.
21. Uzgur S, Usta U, Gökmen SS. The effect of L-lysine on serum sialic acid levels in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Türk J Biochem* 2011;36(3):248-54.
22. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal biochem* 1979;95(2):351-8.
23. Harma M, Harma M, Erel O. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly* 2003;133(41-42):563-6.
24. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos* 1991;19(1):100-6.
25. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000;275(43):33435-42.
26. Ozgun GS, Ozgun E, Eskioçak S, Gökmen SS, Süt N, Akıncı M. Effects of Taurine on Paraonase, Arylesterase and Lactonase Activities in Diabetic Rats. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2016;14(3):157-65.
27. Précourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, Levy E. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis*, 2011;214(1):20-36.
28. Bhagat B, Sullivan JM, Fischer VW, Nadel EM, Dhalla NS. cAMP activity and isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 1976;12:465-70.
29. Fleckenstein A, Janke J, Doring HJ, Leder O. Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload-a new principle in cardiac pathophysiology. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 1974;4:563-80.
30. Yates JC, Dhalla NS. Induction of necrosis and failure in the isolated perfused rat heart with oxidized isoproterenol. *J Mol Cell Cardiol* 1975; 7(11):807-16.
31. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol pathol* 2002;30(6):620-50.
32. McMullan CJ, Rimm EB, Schemhammer ES, Forman JP. A nested case-control study of the association between melatonin secretion and incident myocardial infarction. *Heart* 2017;103(9):694-701.
33. Kumar V, Cotran R S. Kalp. Çevikbaş U, çeviri editörü. *Robbins Temel Patoloji*. 7. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2003. p.361-94.
34. Küçükakin B, Lykkesfeldt J, Nielsen HJ, Reiter RJ, Rosenberg J, Gögenur I. Utility of melatonin to treat surgical stress after major vascular surgery—a safety study. *J Pineal Res* 2008;44(4):426-31.
35. Kocak C, Kocak FE, Akçılar R, Isıklar OO, Kocak H, Bayat Z, Simsek H, et al. Molecular and biochemical evidence on the protective effects of embelin and carnosic acid in isoproterenol-induced acute myocardial injury in rats. *Life Sci* 2016;147:15-23.
36. Tanriverdi LH, Parlakpınar H, Ozhan O, Ermis N, Polat A, Vardi N, Tanbek K, et al. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin promotes myocardial antioxidant response and prevents isoproterenol-induced myocardial oxidative stress in rats. *Free Radic Res* 2017;51(9-10):772-86.
37. Karthikeyan K, Bai BS, Devaraj SN. Efficacy of grape seed proanthocyanidins on serum and heart tissue lipids in rats subjected to isoproterenol-induced myocardial injury. *Vascul pharmacol* 2007;47(5):295-301.
38. Mukherjee D, Roy SG, Bandyopadhyay A, Chattopadhyay A, Basu A, Mitra E, Ghosh AK, et al. Melatonin protects against isoproterenol-induced myocardial injury in the rat: antioxidative mechanisms. *J Pineal Res* 2010;48(3):251-62.
39. Simko F, Bednarova KR, Krajcovicova K, Hrenak J, Celec P, Kamodyova N, Gajdosechova L, et al. Melatonin reduces cardiac remodeling and improves survival in rats with isoproterenol-induced heart failure. *J Pineal Res* 2014;57(2):177-84.
40. Vutharadhi S, Jolapuram U, Kodihela LD. Nutraceutical inherent of Spinacia oleracea Linn. methanolic leaf extract ameliorates isoproterenol induced myocardial necrosis in male albino Wistar rats via mitigating inflammation. *Biomed Pharmacother* 2017;85:239-47.
41. Martinelli N, Girelli D, Olivieri O, Guarini P, Bassi A, Trabetti E, Annarumma L. Novel serum paraoxonase activity assays are associated with coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(4):432-40.
42. Dutta P, Courties G, Wei Y, Leuschner F, Gorbатов R, Robbins CS, Iwamoto Y, et al. Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* 2012;487(7407):325-9.
43. Johansson S, Rosengren A, Young K, Jennings E. Mortality and morbidity trends after the first year in survivors of acute myocardial infarction: a systematic review. *BMC Cardiovasc Disord* 2017;17(1):53.