



Tıp Fakültesi

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**ABDOMİNAL CERRAHİ MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA AYDINLIK-
KARANLIK DÖNGÜSÜNÜN VE MELATONİN RESEPTÖRLERİNİN POST-
OPERATİF İYİLEŞME SÜRECİNDEKİ ROLÜ**

Dr. AHMET AKMERCAN

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2023



Tıp Fakültesi

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**ABDOMİNAL CERRAHİ MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA AYDINLIK-
KARANLIK DÖNGÜSÜNÜN VE MELATONİN RESEPTÖRLERİNİN POST-
OPERATİF İYİLEŞME SÜRECİNDEKİ ROLÜ**

Dr. AHMET AKMERCAN
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN: Prof. Dr. MUSTAFA ÜMİT UĞURLU

İSTANBUL 2023

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim sürecinde bilgi ve tecrübelerini sabırla aktaran ve iyi bir hekim olarak yetişmem için her zaman destek olan kıymetli Hocalarıma;

Büyük bir özveriyle her zaman yol gösteren ve örnek olan abi ve ablalarıma;

Uzmanlık eğitimi süresinde birlikte çalıştığım, sevgi ve saygılarını esirgemeyen asistan arkadaşlarıma;

Birlikte çalıştığım tüm hemşire ve personelimize;

Beni karşılıksız seven, her zaman yanımda olan ve evlatları olmaktan gurur duyduğum Anne ve Babama;

Aynı evde büyüdüğüm, beraber mutlu olduğum, beraber üzüldüğüm Abim ve Kardeşime;

Üniversite sıralarından genel cerrahi uzmanı olduğum güne kadar hep yanımda olan, sevgisini ve desteğini her an hissettiğim sevgili Eşime;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ahmet Akmercan

Ekim 2023

ÖZET

Giriş ve Amaç: Gelişen cerrahi tekniklere rağmen, postoperatif iyileşme sürecinde komplikasyonlar yaygındır. Sirkadiyen ritmi bozan yapay ışıkla aydınlatılmış hastane odalarında bakım verildiği göz önüne alındığında, sürekli ışık maruziyetinin ve melatonin tedavisinin postoperatif iyileşme periyodu üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Ketamin anestezisi altında, yetişkin erkek Sprague-Dawley sıçanlara (n=56) sham-operasyonu (kontrol) veya 20 dakika boyunca superior mezenterik arter klemplenerek intestinal iskemik (abdominal cerrahi) uygulandı. Ameliyatı takiben, iskemik gruplar normal ışık döngüsü (12/12 cerrahi) veya 24 saat-sürekli ışık (24/0 cerrahi) altında takip edildi. “12/12 ve 24/0 cerrahi” gruplarındaki sıçanlara melatonin (10 mg/kg/gün), melatonin+luzindol (melatonin antagonisti, 0.25 mg/kg/gün) veya taşıyıcı enjekte edildi. Sıçanlar 4. günde dekapite edilmeden önce takip eden günlerde davranış testleri yapıldı. Serumda pro-inflamatuar sitokinler (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) ölçüldü. Bağırsak dokularında mikroskobik hasar skorları, oksidan-antioksidan parametreler ve BMAL1 gen ekspresyonu değerlendirildi. Feçes örneklerinde *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria* filumları ölçüldü. İstatistiksel analizler için tek yönlü ANOVA kullanıldı ve p<0.05 istatistiksel anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Ağırlık değişimi, gıda tüketimi, bağırsak hareketliliği ve histolojik hasar skorları tüm gruplarda benzerdi. Lokomotor aktivite, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, taşıyıcı ve melatonin+luzindol ile tedavi edilen “12/12 ve 24/0 cerrahi” gruplarında azalmış (p<0.05-0.01), ancak sadece melatonin ile tedavi edilen gruplarda azalmamıştır. Taşıyıcı ve melatonin+luzindol ile tedavi edilen “12/12 ve 24/0 cerrahi” gruplarında delikli levha testi donma süresinde (anksiyete göstergesi) artış gözlenirken (p<0.05-0.01), melatonin anksiyeteyi ortadan kaldırmıştır. IL-6 seviyeleri taşıyıcı ve melatonin+luzindol ile tedavi edilen “12/12 cerrahi” gruplarında yükselmiş (p<0.05), ancak melatonin ile tedavi edilen gruplarda yükselmemiştir. Bağırsaklardaki reaktif oksijen türleri (ROS) seviyeleri taşıyıcı ve melatonin+luzindol ile tedavi edilen gruplarda yükselmiş (p<0.05-0.001), ancak melatonin ile tedavi edilen gruplarda yükselmemiştir. Taşıyıcı ile tedavi edilen “24 cerrahi” grubunda yükselen bağırsak miyeloperoksidaz aktivitesi melatonin tarafından baskılanmış (p<0.05), ancak luzindol tarafından tersine çevrilmemiştir. 5 günlük sürekli ışığa maruz kalma protokolü BMAL1 gen ifadesini değiştirmiş, ancak sürekli ışık sırasında melatonin reseptörünün bloke edilmesi bağırsak BMAL1 gen ifadesini azaltmıştır. Melatonin tedavisi, ışık siklusundan bağımsız olarak taşıyıcı gruplarında meydana gelen *Proteobacteria* artışını geri çevirmiştir. Tüm cerrahi gruplarında *Bacteroidetes* filumunda artış izlenmiş ve melatonin reseptörlerinin bloke edilmesi artan *Bacteroidetes* filumunu azaltmıştır.

Sonuç: Postoperatif dönemde aydınlık-karanlık döngüsünden bağımsız olarak, melatonin tedavisi anksiyeteyi azaltır, lokomotor aktiviteyi artırır ve reseptöre bağlı bir mekanizma ile ROS oluşumunu ve inflammatuar yanıtı inhibe eder. Melatonin, postoperatif dönemde meydana gelen disbiyozis için potansiyel bir düzenleyici olabilir.

Anahtar Kelimeler: İskemi-reperfüzyon, Laprotomi, Melatonin, Postoperatif derlenme, Cerrahi

ABSTRACT

Introduction and Objective: Despite developing surgical techniques, complications are common during post-surgical recovery. Regarding that care is given in hospital rooms illuminated with artificial light, which disrupts circadian rhythm, our aim was to evaluate impact of continuous light exposure and effect of melatonin treatment on impaired functions during postoperative recovery.

Material and Method: Under ketamine anesthesia, adult male Sprague-Dawley rats (n=56) underwent sham-operation or intestinal ischemia by clamping superior mesenteric artery for 20 min. Following surgery, ischemic groups were placed in normal cycle (NC, 12h/12h-dark/light) or 24h-continuous-light (CL) exposure. Rats in NC/CL ischemic groups were subcutaneously injected with either melatonin (10 mg/kg/day), melatonin+luzindole (melatonin antagonist, 0.25 mg/kg/day) or vehicle. Behavioral tests were made on following days before rats were decapitated on 4 th day. Pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) were measured in serum. Microscopic damage scores, oxidant-antioxidant parameters and BMAL1 gene expression were determined in intestinal tissues. Proteobacteria, Bacteroidetes and Actinobacteria phyla were measured in fecal samples as indicators of microbiota. One-way ANOVA was used for statistical analyses.

Results: Weight change, food consumption, intestinal motility and histological damage scores were similar in all groups. When compared to sham group, locomotor activity was decreased in vehicle- and melatonin+luzindole-treated NC/CL groups ($p < 0.05-0.01$), but not in only-melatonin-treated groups. Increased freezing time on hole-board (indicating anxiety) was observed in vehicle- and melatonin+luzindole-treated NC/CL groups ($p < 0.05-0.01$), while melatonin abolished anxiety. IL-6 levels were elevated in vehicle- and melatonin+luzindole-treated NC-groups ($p < 0.05$), but not in melatonin-treated groups. Levels of reactive oxygen species (ROS) in intestines were elevated in vehicle- and melatonin+luzindole-treated groups ($p < 0.05-0.001$), but not in melatonin-treated groups. Elevated intestinal myeloperoxidase activity in vehicle-treated CL-group was depressed by melatonin ($p < 0.05$), which was not reversed by luzindole. The 5-day protocol of continuous light exposure does not alter BMAL1 gene expression, but blockade of melatonin receptor during continuous light downregulates intestinal BMAL1 gene expression. Melatonin treatment reduced the increase in *Proteobacteria* in vehicle groups, regardless of the light cycle. *Bacteroidetes* phylum was increased in all surgery groups, and blocking melatonin receptors reduced the *Bacteroidetes* phylum.

Conclusion: Independent of light-dark cycle, melatonin treatment reduces anxiety, increases locomotor activity and inhibits ROS generation and inflammatory response during postoperative period by a receptor-dependent mechanism. Melatonin could serve as a potential regulator for dysbiosis that occurs during the postoperative period.

Keywords: Ischemia-reperfusion, Laparotomy, Melatonin, Recovery, Surgery

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	2
ÖZET.....	3
ABSTRACT.....	4
İÇİNDEKİLER	5
TABLolar.....	7
ŞEKİLLER	8
1. KISALTMALAR.....	9
2. GİRİŞ VE AMAÇ.....	12
2.1. GİRİŞ.....	12
2.2. AMAÇ	15
3. GENEL BİLGİLER.....	17
3.1. Abdominal Cerrahi ve Postoperatif Bakım.....	17
3.1.1. Cerrahi stres yanıtı	18
3.2. Sirkadiyen Ritim	24
3.2.1. Sirkadiyen ritmin genel ifadesi.....	24
3.2.2. Sirkadiyen ritmin inflamatuvar-immün yanıt üzerine etkisi	26
3.2.3. Gastrointestinal sistemde sirkadiyen düzenleme	27
3.3. Melatonin.....	29
3.3.1. Melatonin metabolizması	30
3.3.2. Melatonin reseptörleri.....	33
3.3.3. Melatonin işlevleri	34
4. GEREÇ VE YÖNTEM	40
4.1. DeneY Hayvanları ve Deneysel Tasarım	40
4.2. Abdominal Cerrahi Modeli, Işık Protokolü ve Tedaviler	41
4.2.1. Tedaviler.....	43
4.3. Davranış Deneyleri	43
4.3.1. Ağırlık takibi	44
4.3.2. Yem/su tüketimi ölçümü ve kolonik motilite testi.....	44
4.3.3. Lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi.....	44
4.3.4. Anksiyete düzeyinin değerlendirilmesi, delikli levha testi	44
4.4. İnce Bağırsak Motilite Ölçümü	45
4.5. Serum, Doku ve Gaita Örneklerinin Toplanması.....	45
4.5.1. Serumda sitokin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) düzeylerinin ELISA yöntemi ile ölçülmesi.....	46

4.5.2. İnce bağırsak dokularında BMAL1 gen ekspresyon analizi	46
4.5.3. İnce bağırsak dokularının histopatolojik değerlendirilmesi	47
4.5.4. İnce bağırsak dokusunda miyeloperoksidaz aktivitesinin ölçümü	47
4.5.5. İnce bağırsak dokusunda lipit peroksidasyonu ve glutatyon ölçümü	48
4.5.6. İnce bağırsak dokusunda kemiluminesans yöntemi ile reaktif oksijen türlerinin ölçümü	48
4.5.7. Mikrobiyotanın değerlendirilmesi.....	49
4.6. İstatistiksel Analiz.....	49
5.BULGULAR.....	50
4.7. Ağırlık Takibi, Su/Yem Tüketimi ve Kolon Motilite Ölçümü	50
4.8. Davranış Deneyleri	51
4.8.1. Lokomotor aktivite.....	51
4.8.2. Delikli levha testi	52
4.9. İnce Bağırsak Motilitesinin Değerlendirilmesi	54
4.10. Serum sitokin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) Düzeyleri	54
4.11. Kemiluminesans Yöntemi ile Ölçülen Reaktif Oksijen Türleri	56
4.12. Glutatyon, Malondialdehit Düzeyleri ve Miyeloperoksidaz Aktivitesi	57
4.13. Histolojik Bulgular ve Skorum	59
4.14. BMAL1 Gen Ekspresyonu	60
4.15. Bağırsak Mikrobiyota Sonuçları	61
5. TARTIŞMA.....	63
6. SONUÇ.....	71
7. KAYNAKÇA.....	72

TABLÖLAR

Tablo 1. Deney grupları	41
-------------------------------	----



ŞEKİLLER

Şekil 1. Çekirdek saat genleri ve transkripsiyonel/translasyonel geri besleme döngüsü (TTFL).....	26
Şekil 2. Melatonin metabolizması.....	31
Şekil 3. Cerrahi prosedür.....	42
Şekil 4. Deney protokolü.....	43
Şekil 5. Su/yem tüketimi ve kolon motilitesinin karşılaştırılması	50
Şekil 6. Lokomotor aktivite parametrelerinin karşılaştırılması.....	52
Şekil 7. Delikli levha testi sonuçlarının karşılaştırılması.....	53
Şekil 8. İnce bağırsak transit indeksinin karşılaştırılması.....	54
Şekil 9. Serum sitokin düzeylerinin karşılaştırılması.....	55
Şekil 10. Reaktif oksijen türlerinin karşılaştırılması.....	56
Şekil 11. Malondialdehit, glutatyon düzeyleri ve miyeloperoksidaz aktivitesinin karşılaştırılması	58
Şekil 12. Histolojik bulgular ve skorlama.....	59
Şekil 13. BMAL1 gen ekspresyonunun karşılaştırılması.....	60
Şekil 14. Kolonik mikrobiyotanın değerlendirilmesi.....	62

1. KISALTMALAR

12/12	: 12 saat aydınlık- 12 saat karanlık
24/0	: 24 saat aydınlık
AAAD	: Aromatik amino asit dekarboksilaz
AANT	: Arilalkilamin-N-asetil transferaz
ACTH	: Adrenokortikotropin hormon
AFMK	: N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinuramine
AMK	: N1-asetil-5-metoksikinuramine
ARNLT2/MOP9	: “ <i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 2</i> ”
ASH	: Antijen sunan hücre
BMAL1	: “ <i>Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1</i> ”
CIRCI	: Kronik hastalık ilişkili kortikosteroid yetmezliği
CK1	: Kazein kinaz 1
CLOCK	: “ <i>Circadian locomotor output cycles kaput</i> ”
CRH	: Kortikotropin salgılayan hormon
CRP	: C-reaktif protein
CRY	: Kriptokrom
CYP	: Sitokrom P450 monooksijenaz
DAB	: 3,3'-diaminobenzidin
DAMP	: Hasar ilişkili moleküler kalıp
DMSO	: Dimetil-sülfoksit
ELISA	: “ <i>Enzyme linked immunoabsorbent assay</i> ”
ETC	: Elektron transport zinciri
FbxL3	: F-box/LRR tekrar protein 3
GABA	: γ -aminobütirik asit
GİS	: Gastrointestinal sistem
GH	: Büyüme hormonu
GHS-R1a	: Büyüme hormonu-sekretagog reseptörü 1a
GLP-1	: Glukagon benzeri peptid-1

GSH	: Glutatyon
HETAB	: Heksadesiltrimetilamonyum bromür
HIOMT	: Hidroksiindol-O-metiltransferaz
HHA	: Hipotalamik-hipofiz-adrenal aks
IDO	: İndolamin-2,3-dioksijenaz
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL	: İnterlökin
İEH	: İntestinal epitel hücresi
ipRGC	: Fotoseptif retinal gangliyon hücreleri
LPS	: Lipopolisakkarit
MDA	: Malondialdehit
MİF	: Makrofaj inhibitör faktör
MPO	: Miyeloperoksidaz
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MODS	: Çoklu organ disfonksiyonu sendromu
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NPAS2/MOP4	: “ <i>Neuronal period-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator single-minded protein 2</i> ”
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
PACAP	: Hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptit
PAF	: Platelet aktive edici faktör
PAMP	: Patojen ilişkili moleküler kalıp
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PER	: Periyot geni
PGE2	: Prostaglandin E2
PICS	: Kalıcı inflamasyon-immünsüpresif katabolizma sendromu
PRR	: Kalıp tanıma reseptörleri
PVN	: Paraventriküler çekirdek
REV-ERB	: Ters eritrositoz geni
RHT	: Retinohipotalamik yol

ROR	: Retinoid ilişkili yetim reseptör
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RZR	: Retinoid Z reseptörü
SIRS	: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
SKG	: Saat kontrol genleri
SKN	: Suprakizmatik nükleus
SMA	: Süperior mezenterik arter
SMV	: Süperior mezenterik ven
TCA	: Trikloroasetik asit
TH	: Tirozin hidroksilaz
TNF- α	: Tümör nekroz faktörü α
TLR	: Toll-benzeri reseptör
TPH	: Triptofan hidroksilaz
TTFL	: Transkripsiyonel/translasyonel geri besleme döngüleri
VIP	: Vazoaktif intestinal peptid
YBÜ	: Yoğun bakım ünitesi

2. GİRİŞ VE AMAÇ

2.1. GİRİŞ

Günümüzde her yıl milyonlarca kişiye çeşitli nedenlerle abdominal cerrahi girişimler uygulanmaktadır¹. Gelişen cerrahi tekniklere ve cerrahi sonrası bakım stratejilerine rağmen klinik pratik içerisinde abdominal cerrahi sonrası iyileşme sürecinde ciddi sorunlar ile karşılaşlabilmektedir². Karşılaşılan bu sorunlar nedeniyle cerrahi sonrası derlenme sürecini iyileştirmek için yeni stratejiler geliştirme ihtiyacı duyulmaktadır. Bu bağlamda klinik çalışmaların yanında prelinik abdominal cerrahi modellerinin oluşturulması iyileşme sürecinde meydana gelen fizyolojik ve patolojik değişikliklerin anlaşılmasında ve yeni stratejiler geliştirilmesinde faydalı olabilmektedir³.

Cerrahi esnasında meydana gelen doku hasarı, fizyolojik bariyerlerin bozulması, patojenlere kontrollü veya kontrolsüz maruziyet ve anestezi ilaçlarının toksik etkileri organizmada inflamatuvar, endokrin, metabolik ve immünojenik moleküllerin salınımına neden olarak stres yanıtı oluşturmaktadır. Bu stres yanıtının temel bileşeni olan inflamatuvar-immün düzenlemenin patojenlerin ortadan kaldırılması, ölü dokuların temizlenmesi, rejeneratif sürecin başlaması ve dolayısıyla iyileşmenin sağlanması için gerekli olduğu düşünülmektedir. Ancak cerrahi travmanın boyutu, kanama miktarı ve cerrahi süresi arttıkça fizyolojik olarak meydana gelen bu inflamatuvar-immün yanıt dengersiz hale gelebilmektedir. Kontrolsüz, aşırı stres yanıtı ve inflamatuvar kaskad aktivasyonu postoperatif ciddi morbidite ve mortalite durumları ile sonuçlanabilmektedir⁴. Ayrıca postoperatif dönemde aktive olan stres yanıtı bulantı/kusma, ağrı, anhedoni, anksiyete, iştah kaybı ve yorgunluk gibi semptomları içeren hastalık haline neden olmaktadır⁵. Cerrahi sonrası stres yanıtının kontrollü bir şekilde çözülmesine yönelik yeni geliştirilen stratejiler ile hastalık semptomlarının gerileyebileceğini ve postoperatif iyileşmenin hızlandırılabileceğini düşünmekteyiz.

Melatonin hormonu (N-acetyl-5-methoxy-tryptamine) pineal bez tarafından sentezlenir ve sirkadiyen ritmin sağlanması, uykunun düzenlenmesi, modun belirlenmesi, yaşlanma, inflamatuvar-immün modülasyon ve gastrointestinal motilite/sekresyonların düzenlenmesi gibi vücudun pek çok farklı alanında geniş etkilere sahiptir⁶⁻⁹. Ayrıca güçlü bir antioksidan olan melatonin serbest radikal süpürücü olarak da görev alır¹⁰⁻¹². Melatoninin analjezik etkisi prelinik ve klinik çalışmalar ile gösterilmiştir^{13,14}. Yousaf F. ve arkadaşlarının yaptığı derlemede

midazolam ile karşılaştırıldığında melatoninin daha az yan etki profili ile benzer anksiyolitik etki oluşturduğu gösterilmiştir¹⁵.

Melatonin reseptörleri vücudun birçok yerinde olduğu gibi gastrointestinal sistemde de yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Duodenumda yüzeye tutunmuş şekilde rastlanması ise melatoninin gastrointestinal kanal üzerinde de düzenleyici etkilere sahip olduğu fikrini desteklemektedir. Diğer yandan melatonin reseptörlerinin en fazla jejunum ve kolon mukozasında bulunduğu gösterilmiştir¹⁶. Farmakolojik özelliklerine göre melatonin reseptörleri Mel1A, Mel1B ve Mel1C olarak sınıflandırılmıştır. Bunlardan ikisi, Mel1A ve Mel1B, yakın zamanda MT1 ve MT2 reseptörleri olarak yeniden adlandırılmıştır. Hem MT1 hem de MT2 reseptörleri, G-proteinine bağlı reseptör ailesinin üyeleridir ve her ikisinin de luzindol tarafından antagonize edildiği gösterilmiştir¹⁷.

Gastrointestinal transit ve melatonin üzerine yapılmış bazı çalışmalar bir fikir birliği oluşturmamaktadır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada eksojen düşük doz melatonin uygulanması ile bağırsak transitinin hızlandığı, yüksek dozlarda bu etkinin tam tersi olduğu görülmüştür¹⁷. İn vitro çalışmalarda ise ileum ve kolon segmentlerinin spontan kasılmalarının gücü melatonin uygulanması ile azalmıştır ve serotonin ile indüklenen kasılmalar engellenmiştir^{18,19}.

Abdominal cerrahi sonrasında oluşan mikrodolaşım disfonksiyonu, pro-inflamatuar yanıt ve epitel bariyer fonksiyonundaki bozulmaya sekonder bağırsak mikrobiyomunda fırsatçı patojen kayması ile karakterize bir disbiyozis oluşabilir^{20,21}. Son yıllarda yapılan çalışmalarda melatoninin bağırsaktaki yararlı bakteriler üzerine olumlu etkileri raporlanmıştır. Bu çalışmalara göre melatonin intestinal geçirgenliği ve motiliteyi düzeltir, intestinal doku üzerinde antioksidan etkiler yaratır ve probiyotik işlevi görerek mikrobiyotayı regüle eder. Sürekli ışığa maruziyet ya da antibiyotik kullanımı gibi intestinal mikrobiyotayı bozan hastalıklarda melatoninin mikrobiyota üzerine düzeltici etkisi gözlenmiştir²²⁻²⁴.

BMAL1 ve CLOCK gibi transkripsiyon faktörleri Period (PER) ve Cryptochrome (CRY) gibi sirkadiyen saat genlerinin transkripte olmasını sağlamaktadırlar²⁵. BMAL1 ekspresyonu aynı zamanda nükleer reseptörler REV-ERBa ve REV-ERBb ile de kontrol edilmektedir. Bütün bu faktörler sirkadiyen ritm üzerinde anahtar role sahiptirler²⁶. Yapılan çalışmalar gastrointestinal sistemin de

kendi sirkadiyen ritmi olduğunu göstermiştir. Stokes ve arkadaşlarının araştırmasına göre intestinal rejenerasyon sırasında ritmik olarak eksprese olan sitokinler epitelde stres cevabı oluştururlar. Bu ritmik stres cevabını regüle eden BMAL1, intestinal epitelin 24 saat içindeki ritmik proliferasyonunu düzenler²⁷. Ayrıca gastrointestinal sistem dahil olmak üzere birçok sistemde meydana gelen inflamatuvar yanıtta salgılanan TNF- α ve IL-1 gibi sitokinler direkt olarak sirkadiyen ritm genlerinin ekspresyonunundan etkilenirler²⁸. Ancak bildiğimiz kadarıyla literatürde sirkadiyen ritm, immün sistem ve gastrointestinal fonksiyonların 3 yollu korelasyonunu inceleyen çalışmalar bulunmamaktadır²⁹.

Melatoninin sentezi ritmik bir patern izler. Vücudun saati olan suprakiazmatik nükleus bu paterni oluşturur. Siklusun oluşmasındaki en büyük etki aydınlık/karanlık döngüsüdür. Retinadaki ışığa hassas fotoreseptörlerin uyarılması ile melatonin üretimi inhibe edilir, karanlıkta ise tam tersi olur³⁰. Karanlık/aydınlık döngüsünün bozulduğu gece nöbeti, kıtalar arası yolculuk, gece ışığa maruz kalma gibi durumlarda bu siklus bozulur³¹.

Uyku bozuklukları özellikle yoğun bakım ünitesinde yatan kritik hastaların majör sorunlarından birisidir ve kötü uyku kalitesi, dinlendirici uykunun azalması ve sirkadiyen ritmin bozulması ile karakterizedir³². Dinlendirici yavaş dalga uykunun ve REM evresinin süresinin azalmasıyla bozulmuş immün fonksiyonlar, mekanik ventilatörden ayrılamama ve diğer pek çok ciddi morbiditeler de beraberinde gelmektedir³³. Hu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre yoğun bakımdaki gürültü ve ışık nedeniyle nokturnal melatonin baskılanmaktadır. Yine bu çalışmada sağlıklı insanlarla kurulan simule yoğun bakım ünitesinde ışığı kesecek olan uyku maskesi kullanımını nokturnal melatoninini artırmaktadır³⁴. Daha önce yoğun bakımdaki uyku kalitesinin majör abdominal cerrahi sonrası inflamatuvar cevaba olan ilişkisini izleyen bir çalışmada daha az ışık alan ve daha az gürültülü olan bir odada bakılan hastaların normal yoğun bakımda yatan hastalara göre anlamlı olarak daha az CRP, IL-6 seviyesine sahip olduğu görülmüştür. Yine bu hastaların uyku kalite skorları normal odadaki hastalara göre anlamlı olarak daha yüksek tespit edilmiştir³⁵. Yüksek riskli kardiyovasküler cerrahi geçiren hastalarla yapılan diğer bir çalışmada postoperatif iyileşme sonuçlarının öğleden sonra yapılan cerrahilerde daha iyi olduğu

gösterilmiştir³⁶. Bütün bu veriler bize postoperatif iyileşmede sirkadiyen ritmin ve melatoninin etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürde bozulmuş sirkadiyen ritmin; uyku bozuklukları, nörodejeneratif hastalıklar, psikiyatrik hastalıklar, metabolik ve endokrin bozukluklar, karsinogenez ve infertilite gibi çok sayıda sağlık sorununa neden olduğu bildirilmiştir³⁷. Ayrıca gastrointestinal sistemde irritabl bağırsak sendromu, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve sindirim sistemi kanserleri ile ilişkilendirilmiştir³⁸. Kritik bir iyileşme sürecinden geçen ve gece saatleri dahil sürekli ışığa maruz kalan yoğun bakım hastalarında inflamatuvar süreç ve uyku kalitesi üzerine çalışmalar olmasına karşın, genel bir iyileşme süreci izleyen araştırmalar bulunmamaktadır. Aynı zamanda sirkadiyen ritimle postoperatif iyileşme süreci arasında hiçbir araştırmada bağlantı kurulmamıştır.

Oksidotoksinlere maruz bırakma, iskemi/reperfüzyon, majör travma, iyonlaştırıcı radyasyon uygulama yoluyla proapoptotik ve proinflamatuvar sinyaller oluşturulan prelinik deneylerde melatoninin inflamatuvar-immün modülatör etkileri, anti-oksidan ve sitoprotektif etkileri gösterilmiştir⁶. Ancak ne insanlarda ne hayvan çalışmalarında melatoninin postoperatif iyileşme sürecine olan etkisi araştırılmamıştır.

2.2. AMAÇ

Bu çalışmada postoperatif iyileşme sürecinde sirkadiyen ritmin ve melatoninin etkileri değerlendirilecektir. Ayrıca anti-oksidan ve anti-inflamatuvar etkinliği bilinen melatoninin olası koruyucu etkinliğinin mekanizması açıklanmaya çalışılacaktır. Sirkadiyen ritim ve melatoninin postoperatif iyileşme sürecine etkilerini araştıran bu çalışma 4 ayrı hipotez üzerinden tasarlanmıştır;

H1: Sirkadiyen ritmin bozulması postoperatif cerrahi iyileşmeyi geciktirir,

H2: Melatonin tedavisi cerrahi iyileşme sürecinde bozulan sirkadiyen ritmin olumsuz etkilerini iyileştirir,

H3: Normal sirkadiyen ritimde farmakolojik dozda verilen melatonin tedavisi cerrahi iyileşme sürecini hızlandırır,

H4: Endojen melatonin etkilerinin antagonize edilmesi normal sirkadiyen ritimde cerrahi iyileşmeyi olumsuz yönde etkiler.

Bu preklinik çalışmada abdominal cerrahi ve perioperatif 5 günlük iyileşme dönemi taklit edilerek postoperatif dönemde melatonin ve sirkadiyen ritmin iyileşme üzerindeki potansiyel etkileri araştırılacaktır. Luzindol kullanılarak melatonin reseptörlerinin bloke edilmesiyle melatonin yapacağı olası etkilerin reseptörü üzerinden gerçekleştirip gerçekleştirmediği incelenecektir. Abdominal cerrahi sonrasında disbiyozis oluşup oluşmayacağı, sirkadiyen ritmin olası disbiyozise etkisi ve son olarak melatonin bu koşullardaki olası düzeltici etkileri araştırılacaktır. Ayrıca cerrahi stresle birlikte ışık siklusu ve melatoninin gastrointestinal sistem çekirdek saat genlerinden olan BMAL1'in ekspresyonu üzerindeki etkileri incelenecektir.



3. GENEL BİLGİLER

3.1. Abdominal Cerrahi ve Postoperatif Bakım

Dünya çapında sağlık hizmetleri genel olarak bulaşıcı hastalıkların kontrolüne, sağlık eğitimine ve koruyucu sağlık hizmetlerine odaklanmıştır. Ancak son yıllarda sanayileşme ve yaşam süresindeki kazanımlar hastalık eğilimlerini değiştirmiştir. Uzun bir süre cerrahi bakım küresel sağlık sisteminde diğer “ihmal edilen hastalıklar” arasında sayılmaktaydı. Son yıllarda küresel sağlık öncelikleri arasında cerrahi bakımın rolünü tanımlamaya yönelik girişimler artış göstermiştir. Her yıl gerçekleştirilen yaklaşık 234.000.000 cerrahi prosedürle birlikte küresel olarak cerrahi gerektiren önemli bir hastalık yükünün olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte küresel anlamda sağlık hizmetlerinin standart olmaması, cerrahi tanımındaki farklılıklar, veri sistemlerinin eksikliği ve hasta çeşitliliğinin çok fazla olması gibi faktörler nedeniyle cerrahi bakımın gerçek yükü tam olarak bilinmemektedir^{1,39}.

Gastrointestinal sistem (GİS) ve hepatopankreatobilyer sistemin benign ve malign hastalıkları, jinekolojik ve ürolojik hastalıklar, travmalar gibi birçok durum cerrahi girişim gerektirebilmekte olup bu ameliyatların büyük bölümü majör abdominal cerrahi başlığı altında sıralanabilmektedir.

Bu çeşitlilik nedeniyle abdominal cerrahi için net bir insidans belirlenememekle birlikte her yıl farklı endikasyonlarla milyonlarca hastaya abdominal cerrahi prosedürler uygulandığı tahmin edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri’nde yılda yaklaşık 2.000.000 hastaya çeşitli nedenlerle laparotomi gerçekleştirilmektedir⁴⁰.

Gelişen cerrahi tekniklere rağmen majör abdominal cerrahi sonrası meydana gelen morbidite ve mortalite halen ciddi sorun teşkil etmektedir. Günümüzde cerrahi tekniğin yanında ameliyat öncesi ve ameliyat sonrası bakım hizmetlerinin iyileştirilmesinin ameliyatın sonuçlarını doğrudan etkilediği kabul edilmektedir. Postoperatif dönemde morbidite ve mortalite oranlarının azaltılması için fiziki koşulların, bakım ve tedavi stratejilerinin optimize edilmesi gereklidir. Bu nedenle cerrahi bakımın ve postoperatif derlenme sürecinin kalitesinin artırılması için yeni strateji arayışları devam etmektedir².

Cerrahi travma perioperatif dönemde hastalarda hemodinamik, metabolik ve immün değişikliklerle karakterize bir stres yanıtına neden olmaktadır. Bu değişiklikler

linik ve bilimsel gözlemlere göre tanımlanan belirli bir şemayı izleyen dinamik süreçlerdir. Ameliyatın tipi ve büyüklüğü stres yanıtını doğrudan etkiler ve majör abdominal cerrahi girişimler insanda en büyük stres yanıtını oluşturan ameliyatlarda sayılmaktadır. Cerrahiye verilen bu stres yanıtının modülasyonu postoperatif mortalite ve morbidite gelişiminde kritik rol almaktadır⁴¹.

3.1.1. Cerrahi stres yanıtı

Cerrahi lokal doku yaralanması, fizyolojik bariyerlerin bozulması, çevresel ve fırsatçı patojenlere maruziyet ile sonuçlanır ve bunların tümü lokal ve sistemik inflamatuvar kaskadın aktivasyonuna, metabolik ve hemodinamik değişikliklere neden olmaktadır. Cerrahiye takiben meydana gelen sistemik inflamatuvar yanıtın doku hasarı veya hücre stresin bir sonucu olarak üretilen hasarla ilişkili moleküler kalıplar (DAMP) veya alarminler olarak adlandırılan endojen moleküllerden kaynaklandığı yaygın olarak kabul edilmektedir⁴². Moleküler tehlike sinyalleri ve lokal fizyolojik bariyerlerin yıkımı kompleman ve koagülasyon sistemleri tarafından algılanır, aynı zamanda DAMP'lar lökositler üzerindeki kalıp tanıma reseptörlerine (PRR) bağlanarak hücre içi sinyal iletimini indükler ve hücreli bağışıklık yanıtı oluşturur. Genel olarak kemotaksi, sitokinlerin ve kemokinlerin salınımı, reaktif oksijen türlerinin (ROS) metabolizması ve fagositoz gibi işlevlerle ifade edilen stres yanıtı büyük ölçüde pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar denge ile sonuçlanır. Bu dengeli immün-inflamatuvar yanıt zararlı patojenleri ortadan kaldırılması, ölü dokuların temizlenmesi, doku iyileşmesi ve rejeneratif sürecin başlaması için gereklidir. Ancak cerrahi travmanın boyutu, kanama miktarı ve cerrahi süresi arttıkça fizyolojik olarak meydana gelen bu immün-inflamatuvar yanıt dengesiz hale gelebilir. Bu dengesizlik kompleman sisteminin aşırı aktivasyonu, koagülopati, aşırı ROS tepkisi, hücre içi enerji kinetiğinde değişiklikler, membran hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanır. Kontrolsüz hücre ölümü ve endotel hasarı ile birlikte salınan DAMP'lar artar ve bir kısır döngü oluşur. Bu kısır döngü klinikte akut dönemde sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS), sepsis ve çoklu organ disfonksiyonu sendromu (MODS) ile kendini gösterebilir. Ayrıca kronik dönemde protein katabolizması, doğal ve edinilmiş bağışıklık sisteminin baskılanması ile karakterize kalıcı inflamasyon-immünsüpresif

katabolizma sendromu (PICS) ile karşımıza çıkabilir^{43,44}. PICS tabanlı immünolojik metabolik baskılanmanın zayıf yara iyileşmesi, enfeksiyonlara yatkınlık, uzun hastane yatışı ve yüksek mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁴⁵. Ayrıca stres yanıtı, aynı zamanda bulantı/kusma, ağrı, anhedoni, anksiyete, iştah kaybı ve yorgunluk gibi semptomları içeren hastalık haline de neden olmaktadır⁵. Bu nedenle cerrahi sonrası gelişen stres yanıtının kontrollü bir şekilde çözülmesi iyileşme sürecinde kritik rol oynamaktadır.

3.1.1.1. Nöroendokrin ve metabolik yanıt

Merkezi sinir sistemi (MSS), travmaya koordineli bir yanıt oluşturmak için düzenli duyuşal ve motor nöron sistemleri aracılığıyla vücutla iletişim kurmaktadır. Son çalışmalar, MSS'nin, beyindeki düzenleyici alanlara bilgi ileten doğrudan nöral projeksiyonların yanı sıra, çözünür inflamatuvar medyatörler aracılığıyla yaralanma kaynaklı inflamasyon ile ilgili bilgiler aldığını göstermektedir. Örneğin periferden salgılanan çözünebilir inflamatuvar sinyal molekülleri, patolojik durumlarda sirkümventriküler organların pencereli endotelinden veya bozulmuş kan-beyin bariyeri yoluyla doğrudan nöronlara ve glial hücrelere ulaşabilmektedir. Ayrıca, inflamatuvar uyaranlar, beyin parankimini doğrudan etkileyen çeşitli pro-inflamatuvar mediatörler (sitokinler, kemokinler, adezyon molekülleri, kompleman sisteminin proteinleri ve immün reseptörler) aracılığıyla beyin endotel hücrelerinde bulunan reseptörlerle doğrudan etkileşime girebilir. MSS'deki inflamatuvar uyaranlar, artan uyku, uyuşukluk, iştah azalması ve enfeksiyonun en yaygın özelliği olan ateş gibi davranış değişikliklerine neden olur⁴⁶.

Cerrahi travma sonucunda immün yanıtı arttırmak, temel enerji ve yapısal ihtiyaçları karşılamak için gerekli substratları sağlamak için MSS'de karmaşık nöroendokrin sinyaller oluşturulur. Bu yanıtın bileşeni olan iki temel nöroendokrin yol, glukokortikoid hormonların salınmasıyla sonuçlanan hipotalamik-hipofiz-adrenal (HHA) aks ve katekolaminlerin salınmasıyla sonuçlanan sempatik sinir sistemidir. HHA aksın hemen hemen her hormonu, cerrahi travma ve strese karşı fizyolojik yanıtı etkiler, ancak inflamatuvar yanıt üzerinde doğrudan etkisi olan veya ani klinik etkisi olan glukokortikoidler, büyüme hormonu (GH), insülin, makrofaj inhibitör faktör (MİF) ve aldosteronun üzerinde özellikle durulmaktadır.

MSS'nin cerrahi strese yanıt olarak harekete geçirdiği ana mekanizmalardan biri hipotalamik-hipofiz-adrenal (HHA) aksının aktivasyonudur. Yaralanmayı takiben yaralanma bölgesinden alınan afferent sinir lifleri ve dolaşıma salınan sitokinlerin (TNF- α IL-1 β , IL-6) uyarısıyla hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinden (PVN) kortikotropin salgılayan hormon (CRH) salgılanır. CRH, adrenokortikotropin hormonunun (ACTH) sistemik dolaşıma salgılanmasını uyarmak için ön hipofize etki eder. Ayrıca hipotalamus üzerinde etkili olan sitokinler ön hipofizden ACTH salınmasını da uyarabilir. Ön hipofizden salgılanan ACTH, glukokortikoidleri sentezlemek ve salgılamak için adrenal bezleri uyarır. Kortizol, insanlarda başlıca glukokortikoiddir ve önemli metabolik ve anti-inflamatuar etkilere sahiptir. Normal stressiz durumda vücutta kortizol salınımı sirkadiyen pulsatil salınımlarla karakterize sirkadiyen bir ritmi takip eder. Cerrahi stres sırasında ACTH ve kortizolün sirkadiyen salınımlarında artış meydana gelir ve bu ritmik salınım paterninin sağlanması ve korunması iyileşme için kritik öneme sahiptir^{47,48}. Majör travma sonrasında bozulmuş kortikosteroid cevabı ile karakterize abartılı pro-inflamatuar yanıt kritik hastalıkla ilişkili kortikosteroid yetmezliği (CIRCI) olarak adlandırılan klinik duruma neden olabilmektedir ve bu durum yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilidir⁴⁹.

Cerrahi stres anında önemli olan GH özellikle hipofiz bezi tarafından eksprese edilen hem metabolik hem de immünomodülatör etkilere sahip bir nörohormondur. GH, yağ depolarının mobilizasyonunu artırırken hem protein sentezini hem de insülin direncini destekler. GH, etkilerini öncelikle GH reseptörleri ile doğrudan etkileşim yoluyla ve bağırsak mukozal fonksiyonunu iyileştirdiği bilinen bir anabolik büyüme faktörü olan insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) aracılığıyla gösterir. Cerrahi travma sonrasında IGF-1, karaciğerde protein sentezini ve glikojenezi uyarır, yağ dokusunda glikoz alımını ve lipid kullanımını artırır ve iskelet kaslarında glikoz alımına ve protein sentezine aracılık eder. GH, hücrel metabolizma üzerindeki etkilerine ek olarak, artan lizozomal süperoksit üretimi yoluyla inflamasyon bölgesindeki fagositik aktiviteyi artırır. Aynı zamanda T hücre popülasyonlarının çoğalmasını da artırır. Kritik hastalık durumunda dolaşımdaki IGF-1 seviyelerinde belirgin azalma saptanmış olup, GH-IGF-1 aksının baskılanması majör cerrahi travma sonrasında meydana gelen katabolik durumla ilişkilendirilmiştir⁵⁰. Bununla birlikte içerisinde abdominal cerrahi yapılan hastaların da bulunduğu YBÜ hastaları ile

yapılan bir çalışmada yüksek GH dozları artmış hastane kalış süresi ve ventilatör süresi ile ilişkili bulunmuştur⁵¹. Bu bulgular dengeli GH-IGF-1 ekseninin postoperatif iyileşme için önemli olduğunu düşündürmektedir. Temel olarak mide tarafından salgılanan ve iştah arttırıcı olan ghrelinin GH-sekretagog reseptörü 1a (GHS-R1a) için doğal bir ligand işlevi bulunmaktadır. GHS-R1a, bağışıklık hücreleri, B- ve T-lenfositleri ve nötrofiller dahil olmak üzere farklı konsantrasyonlarda çeşitli dokularda eksprese edilmektedir. Ghrelin, bu özelliği ile glikoz homeostazı, lipid metabolizması ve bağışıklık fonksiyonunda rol oynuyor gibi görünmektedir. Bir intestinal iskemi/reperfüzyon modelinde ghrelin uygulamasının proinflamatuvar sitokin salınımını inhibe ettiği, nötrofil infiltrasyonunu azalttığı, bağırsak bariyer disfonksiyonunu iyileştirdiği, organ hasarını hafiflettiği ve sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir⁵².

Cerrahi travma sonrasında aktive olan sempatik sinir sistemi adrenal medulladan katekolaminlerim (epinefrin, norepinefrin) salgılanmasını uyarır. Katekolamin salınımı kardiyak pulmoner ve metabolik etkileri ile stres yanıtının önemli bir parçasıdır. Dengeli bir katekolamin yanıtının amacı immün sistem dahil olmak üzere sistemlerin homeostazisini yeniden kurmak ve sürdürmektir⁵⁰. Dolaşımdaki katekolaminler, sitokin yanıtını doğrudan etkileyebilir. Yüksek dozlarda epinefrin infüzyonunun in vivo olarak tümör nekroz faktörü α (TNF- α) üretimini inhibe ettiği ve anti-inflamatuvar sitokin interlökin 10 (IL-10) üretimini arttırdığı gösterilmiştir⁵³. Ayrıca stres düzeyinde salgılanan epinefrin düzeylerinin glukokortikoidlerle birlikte Th1 yanıtının güçlü bir uyarıcısı olan IL-12'nin üretimini engellediği bildirilmiştir. Bu nedenle, adrenal bezden salgılanan katekolaminler, özellikle epinefrin, hem doğal pro-inflamatuvar sitokin regülasyonunda hem de edinilmiş Th hücre yanıtında rol oynar ve sitokin aktivitesini modüle etmek için cerrahi stres yanıtı sırasında kortizol ile uyum içinde hareket edebilir⁵⁴.

3.1.1.2. Mikrodolaşım disfonksiyonu

Major cerrahi sırasında hipoperfüzyona sekonder mikrodolaşım bozuklukları yaygın olarak görülmektedir. İnflamatuvar-immün kaskadın yanında organ fonksiyonlarını ve hemodinamiyi düzenleyen sempatik sinir sistemi yaygın bir stres yanıtı oluşturur. Sempatik sistem yanıtıyla birlikte arteriyol ve venüllerde meydana

gelen vazokonstriksiyon dokularda hidrostatik basıncın artmasına, kapiller kan akımının azalmasına ve hipoksiye neden olur. Hipoksik ve asidik mikro çevre ROS yanıtını, endotel hasarını, kompleman aktivasyonunu, koagülopatiyi, inflamatuvar hücrelerin göçünü ve pro-inflamatuvar sitokin salınımını şiddetlendirir. Derin vazokonstriksiyon hasarlı endotel hücrelerinden salgılanan vazodilatatör nitrik oksit (NO) ile dengelenmeye çalışılır. Bununla birlikte uzamış ve kontrolsüz NO üretimi mikrodolaşım bozukluklarını güçlendirerek ciddi morbidite ve mortalite potansiyeli olan kapiller sızma sendromuna neden olabilmektedir^{41,44}.

3.1.1.3. Sitokin yanıtı

İnflamatuvar-immün yanıtın önemli bir bileşeni olan sitokin kaskadı hasta üzerinde çeşitli etkilere neden olan karmaşık bir biyokimyasal süreçtir. Pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar etkilere sahip olan sitokinler inflamatuvar süreci yaralanma alanına yönlendiren ve yara iyileşmesi için önemli olan immün araçlardır. Bununla birlikte abartılı proinflamatuvar sitokin yanıtı hemodinamik instabilite ve metabolik düzensizliklere neden olabilir⁵⁵. Yaralanma alanında üretilen ve salınan çok sayıda sitokin ve kemokin bulunmaktadır, ancak bu bölümde inflamasyonun ana sitokinleri olan tümör nekroz faktörü α (TNF- α) ve interlökin 1 (IL-1) ve interlökin 6 (IL-6) üzerinde durulacaktır.

Proinflamatuvar sitokin yanıtı yaralanma bölgesindeki monosit ve makrofajlar tarafından başlatılır. İlk olarak salınan lokal sitokinler TNF- α ve IL-1'i içerir. TNF- α , strese yanıtında salınan ilk sitokindir, özellikle makrofajlar, dentritik hücreler ve T lenfositleri gibi bağışıklık hücrelerinden salınır. Sistemik dolaşımında yarı ömrü kısa olsa da hemen hemen her hücrede önemli etkiler ortaya çıkarır. Katabolizmayı artırır, insülin direnci oluşturur, kas yıkımını ve kaşeksiyi uyarır. TNF- α , endotel hücre geçirgenliğini artırır, pıhtılaşma aktivasyonuna, inflamatuvar hücre göçüne ve makrofaj fagositozuna aracılık eder. Ayrıca adezyon molekülleri, prostaglandin E2 (PGE2), platelet aktive edici faktör (PAF), glukokortikoidler ve eikosanoidlerin ekspresyonunu artırır⁵⁶.

IL-1 sitokin ailesi sitokin yanıtının önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Bu sitokin ailesinin 11 farklı üyesi tanımlanmıştır, bunların en bilinenleri IL-1 α ve IL-1 β ve interlökin 1 reseptör antagonistidir (IL-1Ra). TNF- α ile benzer pro-inflamatuvar etki

profiline sahip olan IL-1 α ve IL-1 β neredeyse tüm hücrelerde bulunan ortak reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterirler. Ayrıca anterior hipotalamusta prostaglandin aktivitesini düzenleyerek ateş yanıtı oluştururlar.

İlk salınan sitokinler olarak TNF- α ve IL-1 β , IL-6 başta olmak üzere diğer sitokinlerin salınımını uyarır. Dolaşımda IL-6 travmadan 60 dk sonra saptanabilir, 4-6 saatte pik yapar ve 10 güne kadar tespit edilebilir. IL-6 akut faz yanıtının hepatik aşamasını düzenler ve başta C-reaktif protein (CRP) olmak üzere serum amiloid A, prokalsitonin, kompleman C3 gibi akut faz proteinlerinin salınımını uyarır⁵⁷. Lenfositlerde, B hücrelerinin olgunlaşmasını ve Th17/Treg dengesini düzenler. Aynı zamanda anjiogenezi ve lokal inflamasyonla ilişkili olarak pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını ve damar geçirgenliğini artırır⁵⁸. Travma hastalarını içeren yakın zamanlı bir meta-analizde ilk 24 saat içindeki IL-6 konsantrasyonlarının yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir⁵⁹. Ayrıca IL-6 post-operatif erken dönemde pro-inflamatuar bir sitokin olarak işlev göstermesine rağmen ilerleyen dönemde TNF- α ve IL-1'in aktivitesini zayıflatarak anti-inflamatuar etki de gösterebilir.

3.1.1.4. Majör cerrahi sonrası gastrointestinal sistemde meydana gelen inflammatuar-immün değişiklikler ve bariyer disfonksiyonu

Major abdominal cerrahi sonrası stres tepkisiyle splanknik vazokonstriksiyon yoluyla kan akışının merkezileşmesi ve direkt olarak bağırsak dokusuna yapılan travmatik müdahaleler bağırsak dokusunda, özellikle de oldukça hassas villuslarda hipoksi ve iskemiye yol açar²¹. Sonuç olarak, intestinal epitel hücreleri (İEH), inflammatuar lökositleri çeken ve uzak organ hasarın indükleyen DAMP'leri ve sitokinleri serbest bırakarak yanıt verir. Ayrıca, lokal ve sistemik olarak aktive olan kompleman sistemi, kompleman birikimi ve hasarlı hücrelerin opsonizasyonu ile birlikte lökositlerin toplanmasına ve aktivasyonuna da katkıda bulunabilir⁶⁰. İnflamatuar ortama yanıt olarak, İEH'ler arasındaki bağlantılarda azalma, hücre içi pH değişiklikleri, hücresel şişme, apoptoz ve nekroz meydana gelebilir²¹. Cerrahi travmaya yanıt olarak, mukus salgılayan Goblet hücreleri ve İEH'lerin intralüminal pankreatik proteazlar tarafından sindirilmesi ile birlikte oksidatif stres tarafından mukozal bariyer hasar görür^{61,62}. Ayrıca Paneth hücrelerinde apoptoz meydana gelebilir, bu da konak savunma

peptitlerinde azalmaya neden olur. Majör abdominal cerrahi sonrasında ortaya çıkan bu durumlar, bağırsak mikrobiyomunda fırsatçı patojen artışı ile karakterize bir disbiyozisle sonuçlanabilir^{20,21}. Cerrahi travma sonrasında DAMP'lar aracılığıyla başlatılan inflamatuvar-immün yanıtı ek olarak fırsatçı patojenlerden kaynaklanan patojen ilişkili moleküler kalıplar (PAMP) hem lokal inflamatuvar yanıtı hem de bozulan bariyer fonksiyonu sonucunda portal venöz sistem üzerinden sistemik dolaşıma salınarak sistemik inflamatuvar yanıtı şiddetlendirebilir^{63,64}.

3.2. Sirkadiyen Ritim

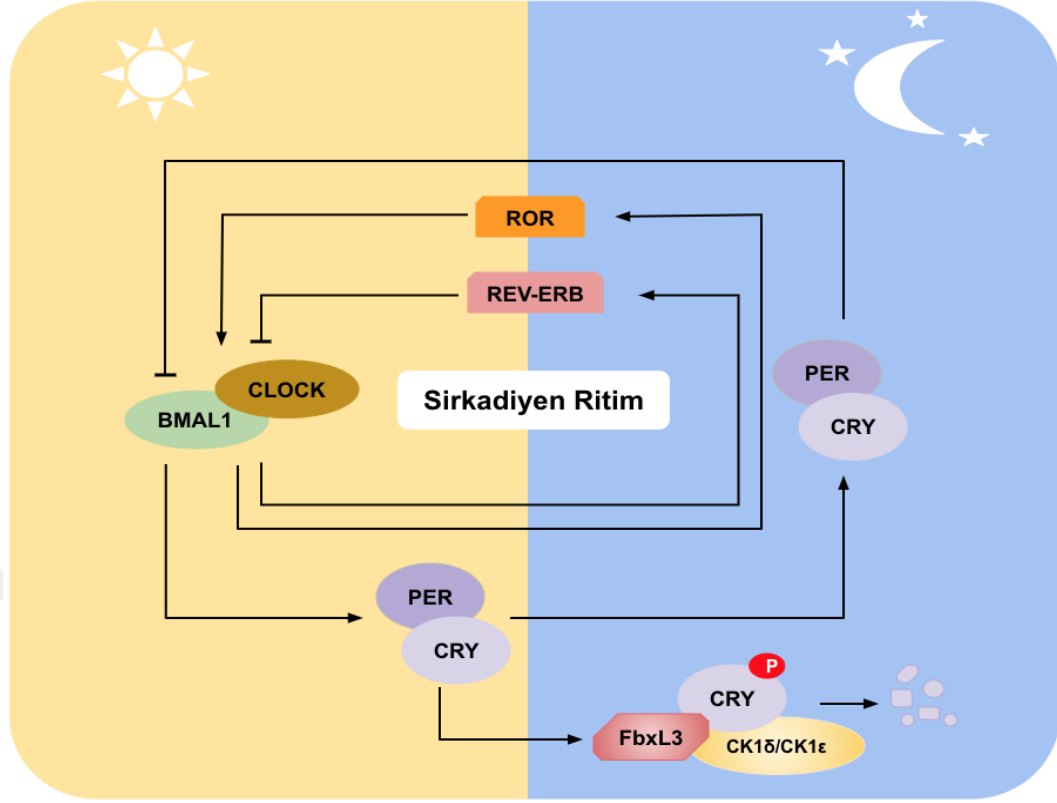
Sirkadiyen ritimler tek hücreli canlılardan memelilere kadar birçok organizma tarafından sergilenen yaklaşık 24 saatlik kalıplardır. Sirkadiyen saatler insanlarda uyku-uyanıklık döngüsü, çekirdek vücut ısısı, kalp atış hızı, kan basıncı, beslenme düzeni, metabolizma, hormon salgılanması, bağışıklık tepkileri ve nöronal fonksiyonlar gibi çok çeşitli fizyolojik süreçte belirleyicidir³⁷. Işık, uyku, gıda alımı, egzersiz ve sıcaklık sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde “zeigterberler” (saat düzenleyiciler) olarak önemli rol oynarlar. Hipotalamusta bulunan suprakizmatik nükleus (SKN) ana sirkadiyen kalp pili olarak kabul edilse de diğer beyin bölgeleri ve periferik birçok doku kendi kendini idame ettiren sirkadiyen saatleri içerir. Bu periferik saatlerin hormon salgısı, bağışıklık yanıtı ve gastrointestinal fonksiyonlar dahil birçok yerel fizyolojiyi düzenlediği gösterilmiştir.

3.2.1. Sirkadiyen ritmin genel ifadesi

Optik kiazmanın üzerinde yerleşen SKN memeli beyinde bir ana saat görevi görmektedir. Işık ortamıyla ilgili mesaj fotoseptif retinal gangliyon hücreleri (ipRGC) tarafından alındıktan sonra retinohipotalamik yol (RHT) ile hipotalamustaki SKN çekirdeklerine iletilir. SKN'de başlayan sinyal iletim süreci saat genlerinin ekspresyonunu düzenler ve sirkadiyen ritimler oluşur⁶⁵. SKN'de oluşturulan sinyaller fizyolojik ve davranışsal işlevlerin düzenlenmesi için periferik organlara ulaşır. Bununla birlikte SKN aracılı düzenlemeye rağmen, vücudun tüm hücreleri, sirkadiyen ritimleri sürdürmek için otonom olarak işlev görebilen endojen bir saat sistemine sahiptir. SKN ile periferik doku saatleri arasında sirkadiyen ritimleri senkronize etmek için nöral ve hormonal aracılı kompleks bir bağlantı mevcuttur⁶⁶.

SKN ve diğer dokulardaki hücresel sirkadiyen ritim çekirdek saat genlerinin ifadesini kontrol eden transkripsiyonel/translasyonel geri besleme döngüleri (TTFL'ler) tarafından düzenlenir. Tanımlanmış çekirdek saat genleri şunlardır: 3 period geni (PER1-3), 2 “*cryptochrome*” geni (CRY1-2), “*brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1*” geni (BMAL1), “*circadian locomotor output cycles kapu*” gen, (CLOCK), 3 “*retinoid-related orphan receptor*” geni (ROR; α , β ve γ) ve 2 “*reverse-erythroblastosis*” geni (REV-ERB; α ve β)^{67,68}. Ayrıca spesifik bir enzim olan “*casein kinase 1*” (CK1; δ and ϵ), “*neuronal period-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator single-minded protein 2*” (NPAS2/MOP4), “*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 2*” (ARNTL2/MOP9) ve “*F-box/LRR repeat protein 3*” (FbxL3) proteinleri de sirkadiyen ritimle ilişkili diğer moleküllerdir³⁷.

SKN'de ve periferik dokularda sirkadiyen ritimin düzenlenmesi saat kontrollü genlerin (SKG'ler) ifadesi ile ilişkilidir. Bu genler CLOCK-BMAL1 heterodimerinin bağlanması için spesifik bir nükleotid dizisi (CACCTG) içeren E-kutuları içerir. CLOCK-BMAL1 heterodimerinin E-kutusuyla bağlanması ile birlikte transkripsiyon ve takiben translasyon olaylarını başlatılır. CLOCK-BMAL1 heterodimeri PER, CRY, ROR α ve REV-ERB α 'nın ekspresyonuna aracılık eder. CLOCK-BMAL1 heterodimeri E-kutusuyla bağlandıktan sonra PER ve CRY'nin ekspresyonunu etkiler. PER ve CRY'nin sitoplazmada çevrilmesi, bunların birikmesini teşvik eder ve bir heterodimer oluşturur. Oluşan PER-CRY kompleksi nukleusa hareket ederek CLOCK-BMAL1 kompleksinin işlevlerini inhibe eder. PER ve CRY konsantrasyonları geceleri azalır ve inhibe edici etkileri ortadan kalkar. Sitoplazmik CK1 δ /CK1 ϵ ve FbxL3, PER-CRY kompleksinin bozulmasında rol alır. CK1 δ ve CK1 ϵ fosforilasyon ve ubikuitinasyondan sonra PER proteinlerini ayırır ve FbxL3 fosforillenmiş CRY'lerin yıkımını sağlar^{69,70}. Bu olaylar, yeni bir CLOCK-BMAL1 aracılı transkripsiyonel döngünün başlamasını sağlar. Bu geri besleme döngüleri 24 saatlik periyodun oluşturulmasından sorumludur. ROR α ifadesinin artması CLOCK-BMAL1 ekspresyonunu indüklerken, REV-ERB α ifadesinin artması ekspresyonu baskılar⁷¹. Ayrıca BMAL1'in transkripsiyonel aktiviteyi düzenlemek için CLOCK'a alternatif olarak özellikle periferik dokularda NPAS2(MOP4) ile kompleks oluşturduğu bildirilmiştir⁷².



Şekil 1. Çekirdek saat genleri ve transkripsiyonel/translasyonel geri besleme döngüsü (TTFL).

3.2.2. Sirkadiyen ritmin inflamatuvar-immün yanıt üzerine etkisi

Bağışıklık yanıtının neredeyse her kolunun (doğal ve edinilmiş) sirkadiyen bir şekilde salındığı bilinmektedir. Doğal ve edinilmiş bağışıklık hücrelerinin üretim ve yıkımında, bakteriyel enfeksiyonlara ve endotoksin aracılı septik şoka yanıtta, sinyal tanıma reseptörlerinin ekspresyonunda, fagositozda, kompleman ve pıhtılaşma faktörlerinin salgılanmasında, sitokinlerin ve kemokinlerin üretiminde ritmik salınımlar meydana gelmektedir⁷³. Sepsis modellerinde farelerin aktif faza geçmeye başladıklarında mortalite oranının arttığı ve bu bulgunun artan bağışıklık hücre metabolizması ve sitokin üretimi ile uyumlu olduğu gösterilmiştir⁷⁴. Sirkadiyen ritmi bozulan farelerde lipopolisakkaritlerle (LPS) indüklenen sepsiste, peritoneal makrofajlarda ve IL-6 üretiminde artış olduğu gösterilmiştir⁷⁵. Bazı “Toll like receptor”lerin (TLR) ekspresyonunun sirkadiyen ritimle değişiklik gösterdiğine dair kanıtlar bulunmaktadır⁷⁶. CLOCK ve BMAL1’in inflamatuvar yanıtın ana aracısı olan NF-κB’yi regüle ettiği gösterilmiştir. CLOCK tek başına NF-κB yanıtını ve dolayısıyla

inflamatuvar sitokinlerin üretimini artırırken CLOCK-BMAL1 heterodimeri bu yanıtı tersine çevirip inflamatuvar yanıtı azaltma yeteneği sergilemektedir⁷⁷. Dolaşımdaki monositlerin ve bunların dokuya göçünün BMAL1 tarafından regüle edildiği gösterilmiştir⁷⁸. BMAL1'in ekspresyonu düzenlediği REV-ERB α 'nın özellikle IL-6'yı baskılayarak sitokin üretimini ritmik olarak baskıladığı bildirilmiştir⁷⁹. Ayrıca T ve B lenfositlerinin dolaşımdaki kortikosteroid düzeyleri ile antifazik ilişki gösterdiği bilinmektedir. Glukokortikoid metabolizmasının sirkadiyen salınımlar göstermesi, sirkadiyen ritimin dolaşımdaki lenfosit düzeylerini dolaylı olarak düzenlediğini desteklemektedir.

3.2.3. Gastrointestinal sistemde sirkadiyen düzenleme

Pankreas adacıkları, karaciğer, adipoz doku, iskelet kası ve gastrointestinal sistem dahil olmak üzere metabolik dokuların hepsinin, günlük metabolik homeostazı koordine etmek için birlikte hareket eden hücresel saatler ifade ettiği gösterilmiştir⁸⁰. GİS sindirim ve emilimin yanı sıra bariyer bütünlüğünün korunması, aktif bağışıklık sisteminin varlığı ve endokrin fonksiyonlarıyla organizma için benzersiz bir role sahiptir ve bu yaşamsal işlevlerin sirkadiyen varyasyonlar gösterdiği bilinmektedir. Ana saat düzenleyici ışığa ek olarak beslenme içeriği ve zamanlamasının GİS'te sirkadiyen düzenlemenin temel belirleyicilerinden olduğu gösterilmiştir^{81,82}. Bununla birlikte mikrobiyotanın bileşiminin ve işlevinin sirkadiyen ritimle değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar bu etkileşimin çift yönlü olduğunu ve mikrobiyotanın sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiştir⁸³⁻⁸⁵.

GİS'te emilim oranları, mukozal enzim aktivitesi, bağırsak ve kolon motilitesi, gastrik boşalma zamanı gibi ritmik süreçler moleküler saatler tanımlanmadan önce karakterize edilmiştir⁸². Sindirim sisteminde moleküler saat genlerinin ekspresyonunun gösterilmesiyle sirkadiyen ritim ile GİS fonksiyonlarındaki ilişki daha net anlaşılmıştır. İnsanlarda ve deney hayvanlarında sirkadiyen ritimin bozulmasıyla sindirim sistemindeki fizyolojik motilitenin olumsuz etkilendiği bilinmektedir. PER1/2 mutant farelerin gaita çıkışı, intrakolonik motilite ve kolonik kas kasılmalarında ritmik değişiklikler ortadan kalkmıştır⁸⁶. CLOCK ve PER3 gen polimorfizmi olan insanlarda mide boşalmasının geciktiği bildirilmiştir⁸⁷. Sindirim

sisteminde enzim salgısının ve aktivitesinin sirkadiyen ritimle değişiklik gösterdiğini ve protein, karbonhidrat ve yağların sindirim ve emiliminin sirkadiyen ritimden etkilendiğini gösteren kanıtlar mevcuttur⁸⁸. Ayrıca ghrelin, leptin, GLP-1, GIP gibi önemli enteroendokrin hormonların sirkadiyen ritimle düzenlendiği gösterilmiştir⁸⁰.

Esas olarak mide tarafından üretilen oroksijenik bir hormon olan ghrelinin hem insanlarda hem de kemirgenlerde gün içerisinde ritmik bir şekilde salgılandığı bilinmektedir⁸⁹. PER1/2 mutant farelerde ghrelin salgısının ritmik paterninin bozulduğu gözlenmiştir⁹⁰. Ayrıca ghrelinin bir hepatosteatoz modelinde bozulmuş sirkadiyen saati düzeltebileceği gösterilmiştir⁹¹. Bu bulgular sirkadiyen ritim ile ghrelin salınımı arasında çift yönlü bir ilişki olduğunu düşündürmekle beraber kesin mekanizma henüz aydınlatılamamıştır.

PER1/2 mutant farelerde GİS'te bariyer bütünlüğü ve immün modülasyon sirkadiyen ritimle ilişkilidir. Kolon epitelinde sıkı bağlantı proteinleri olan okludin ve caludin1'in CLOCK-BMAL1 heterodimerinin ilgili gen promotörüne ritmik bağlanmasıyla yönlendirilen sirkadiyen modeller sergilediği gösterilmiştir⁷³. CLOCK ve PER2 mutant farelerde bağırsak geçirgenliğinde ve inflamasyon yanıtında artış gözlenmiştir⁹². Genetik modellere ek olarak sürekli ışığa maruz bırakılan farelerin bağırsaklarında inflamatuvar yanıtın ve kript epitelinde apoptozun arttığı gösterilmiştir⁹³. Deneysel kolit modellerinde sirkadiyen ritmi bozulan farelerde hastalığın aktivitesinin ve seyrinin daha şiddetli olduğu gösterilmiştir^{94,95}. Ayrıca sirkadiyen ritim GİS'te nötrofil göçünün, doğal bağışıklık sistemi elemanlarının ekspresyonunun ve patojenlere karşı duyarlılığın önemli belirleyicilerindedir^{96,97}.

Sindirim sisteminde hücre proliferasyonu, göçü, farklılaşması ve hatta yapısı, sindirim sisteminin farklı bölümlerinde günün saatine göre değişiklik gösterir. Stokes ve arkadaşları intestinal rejenerasyon sırasında ritmik stres cevabı oluştuğunu ve BMAL1'in bu yanıtı regüle ederek intestinal epitelde 24 saat içindeki ritmik proliferasyonunu düzenlediğini göstermişlerdir²⁷. Başka bir çalışmada CLOCK mutant farelerde kolondaki ritmik hücresel proliferasyonun bozulduğu izlenmiştir⁹⁸. Ayrıca kolorektal kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen CLOCK geninin hücre proliferasyonunu arttırdığı ve apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir⁹⁹.

İnsanda en geniş ve kompleks mikrobiyal topluluk GİS'te bulunur. Gastrointestinal mikrobiyota kompleks polisakkaritlerin sindirimi, patojenlere karşı defans, vitamin sentezi ve enerji homeostazisi (besinlerin algılanması, tokluk ve vücut ağırlığının düzenlenmesi) üzerindeki etkileri nedeniyle enteroendokrin sistemin önemli bir bileşeni olarak kabul edilmektedir⁸⁵. *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* suşları insanlarda ve kemirgenlerde sindirim sistemindeki tüm mikrobiyotal topluluğun büyük bölümünü oluşturur¹⁰⁰. Sindirim sistemindeki mikrobiyal dengenin değişmesi (intestinal disbiyozis) artmış sistemik inflamasyon, metabolik sendrom ve obezite ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte disbiyozisin lokal olarak intestinal motiliteyi bozduğu, bağırsak endotel geçirgenliğini arttırdığı, inflamasyonu ve dolayısıyla endotoksemiye arttırdığı gösterilmiştir¹⁰¹. Birçok çalışma mikrobiyota bileşiminin sabit olmadığını ve gün içerisinde değişiklikler gösterdiğini ortaya koymuştur^{84,102}. Ayrıca beslenme içeriği ve zamanlaması gibi çevresel faktörlerin yanında sirkadiyen salınımların da bağırsak mikrobiyotasını etkilediği gösterilmiştir. Voigt ve arkadaşları farelerde aydınlık/karanlık siklusunun bozulmasının disbiyozise neden olduğunu göstermiştir¹⁰³. Bununla birlikte sirkadiyen gen mutasyonlarının da disbiyozise neden olduğu bildirilmiştir. CLOCK mutasyonunun özellikle alkol tüketimi ile şiddetlenen proinflamatuvar bakterilerin artışı ile karakterize disbiyozise neden olduğu gösterilmiştir¹⁰⁴. BMAL1 ve PER1/2 mutant farelerde bozulmuş sirkadiyen ritim sonucunda intestinal mikrobiyal dengenin olumsuz yönde değişiklik gösterdiği gözlenmiştir^{102,105}.

3.3. Melatonin

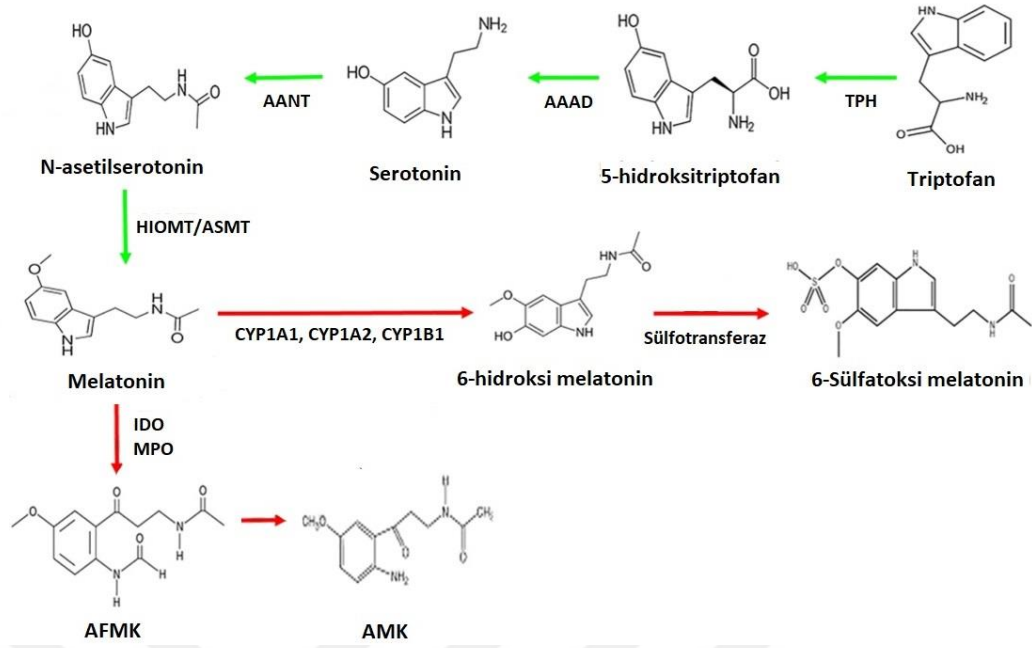
Reseptör aracılı ve reseptörden bağımsız birçok fizyolojik etkiye sahip bir indol olan melatonin ilk olarak 1950'lerde Lerner ve arkadaşları tarafından sıgır epifiz bezinden izole edilmiştir^{106,107}. Melatonin, tanımlandıktan sonra üreme davranışları üzerine etkileri araştırmış ve ışığa duyarlı türlerde mevsimsel üreme kabiliyeti üzerine etkili olduğu gösterilmiştir¹⁰⁸⁻¹¹⁰. İlerleyen yıllarda sirkadiyen ritim ve metabolizma üzerindeki düzenleyici etkilerinin anlaşılmasıyla daha önemli hale gelmiştir^{111,112}. Uzun yıllar boyunca melatoninin temel olarak sirkadiyen ritim ve mevsimsel üreme davranışlarının düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmüştür. Ancak, son yıllarda melatoninin epifiz bezi dışında farklı organ ve dokularda (merkezi sinir sistemi,

gastrointestinal sistem, kemik iliği, lökositler ve deri) da sentezlendiğinin ve melatonin reseptörlerinin farklı dokularda (ince bağırsak, kolon, safra kesesi, pankreas, yağ dokusu, meme, immün sistem hücreleri, kalp, koroner ve serebral arterler) eksprese edildiğinin gösterilmesiyle melatonin işlevlerinin yeniden değerlendirilmesine neden olmuştur⁶. Melatonin, antioksidan, antiinflamatuvar, onkostatik ve immün modülatör etkilerinin keşfiyle birlikte yalnızca bir hormon olmaktan çıkarılıp çok işlevli bir molekül olarak yeniden sınıflandırılmıştır^{7,113,114}.

3.3.1. Melatonin metabolizması

Melatonin sentezi epifiz bezi ve birçok ekstrapineal dokuda meydana gelmektedir. Melatonin, tüm dokularda L-triptofandan 4 ardışık reaksiyon ile sentezlenir. Triptofan ilk olarak mitokondri içinde triptofan 5-hidroksilaz (TPH) ile 5-hidroksitriptofana (5-HTP) dönüştürülür. Sonraki adımda 5-HTP sitozolde aromatik amino asit dekarboksilaz (AAAD) ile serotonine dönüştürülür. Üçüncü adımda serotonin sentez basamaklarının hız kısıtlayıcı enzimi olan arilalkilamin-N-asetil transferaz (AANT) ile N-asetilserotonine dönüştürülür. Son adımda N-asetilserotonin, hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT/ASMT) ile metillenerek melatonin sentezlenir¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Melatonin, vücutta temel olarak iki ana yolla metabolize olmaktadır. Birinci yolda, karaciğerde sitokrom P450 monooksijenaz (CYP1A2, CYP1A1 ve CYP1B1) sistemi ile hidrosillenerek 6-hidroksimelatonine dönüştürülür. Daha sonra 6-hidroksimelatonin, sülfat veya glukuronid grubu ile konjuge edilir ve idrar ile vücuttan atılır. İkinci yolda melatonin, miyeloperoksidaz (MPO) veya indolamin-2,3-dioksijenaz (IDO) ile N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinuramine (AFMK) ve sonrasında daha stabil olan N1-asetil-5-metoksikinuramine (AMK) dönüştürülür. Melatonin ayrıca hücre içi veya hücre dışı serbet radikallerle ve diğer oksidanlarla non-enzimatik olarak metabolize edilebilmektedir^{8,116}.



Şekil 2. Melatonin metabolizması

TPH: Triptofan hidroksilaz, AAAD: Aromatik amino asit dekarboksilaz, AANT: Arilalkilamin-N-asetil transferaz, HIOMT: Hidroksiindol-O-metiltransferaz, MPO: Miyeloperoksidaz, IDO: İndolamin-2,3-dioksijenaz, AFMK: N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinuramine, AMK: N1-asetil-5-metoksikinuramine

3.3.1.1. Epifiz bezinde melatonin sentezinin düzenlenmesi

Sirkadiyen ritim ve fotoperiyod, pineal melatonin sentezinin en güçlü dış düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir. Fotoreseptif retinal gangliyon hücreleri (ipRGC) 460-480 nm ışık dalga boyunu algılayarak fotoperiyodik bilginin epifiz bezine transferini düzenler¹¹⁸. Işık ortamıyla ilgili mesaj ipRGC tarafından alındıktan sonra retinohipotalamik yol ile hipotalamustaki suprakiazmatik nukleusa aktarılır. Işık ortamı bilgisinin SKN'den epifiz bezindeki pinealositlere aktarılması hipotalamusun paraventriküler çekirdeği, T1-T3 intermediolateral sütündeki ve superior servikal gangliondaki sinapsları içeren bir dizi sinir iletim yolu ile sağlanır. Pinealosit zarında postganglionik sempatik liflerden salınan norepinefrin, β 1-adrenerjik reseptörleri uyarak sırasıyla sitoplazmik siklik adenozin monofosfat (cAMP), protein kinaz A ve AANT aktivasyon kaskadını tetikleyerek melatonin salgısını düzenler¹¹⁹⁻¹²¹. Pineal melatonin sentezinin diğer düzenleyicileri arasında vazoaktif intestinal peptid (VIP),

hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptit (PACAP) ve α 1-adrenerjik reseptörlerin de rol oynadığı gösterilmiştir¹²². Epifiz bezi dışı dokuların büyük bölümünde melatonin sentezinin ışık periyodu tarafından düzenlenmemesine rağmen, epifiz bezinde tarif edilen metabolik yollarla gerçekleştiği bilinmektedir.

3.3.1.2. Gastrointestinal sistemde melatonin sentezinin düzenlenmesi

Gastrointestinal sistemde melatonin, ilk olarak 1974 yılında apendikte tanımlanmıştır¹²³. Daha sonra tüm GİS'te enterokromaffin hücrelerin melatonin sentezleyebileceği^{124,125} ve bunu takiben tüm GİS mukozasında melatonin varlığı gösterilmiştir¹²⁶. Gastrointestinal sistemde melatonin sentezinin ana enzimlerinden olan AANT ve ASMT'nin gösterilmesiyle GİS'te epifiz bezinden bağımsız melatonin sentezinin olduğu kabul görmüştür^{127,128}. Ayrıca, pinealektomi yapılan sıçanlarda GİS'te melatonin seviyesinin değişmediğinin tespit edilmesi GİS'in önemli miktarda melatonin sentezlediğini doğrulamıştır¹²⁹. Daha ileri araştırmalar GİS'teki melatonin seviyesinin serumdaki melatonin seviyesinden 10-100 kat fazla olduğunu ve GİS'in epifiz bezinden 400 kat daha fazla melatonin içerdiğini göstermiştir^{130,131}. GİS'te üretilen melatoninin hepatik portal ven yoluyla dolaşımdaki melatonin konsantrasyonuna önemli katkıda bulunduğu ortaya konmuştur¹³¹⁻¹³³. Ayrıca safradaki yüksek melatonin konsantrasyonunun GİS lümenindeki melatonin seviyelerine katkıda bulunduğu ve GİS mukozasını oksidatif stresten koruduğu düşünülmektedir¹³⁴. GİS florasında bulunan bazı mikroorganizmaların bağırsak lümeninde alternatif bir melatonin kaynağı olabileceği bildirilmiştir¹³⁰.

Epifiz bezi ve GİS arasında melatonin sentezinin düzenlenmesi ve melatonin konsantrasyonları açısından önemli farklılıklar vardır. GİS'teki melatonin miktarlarının belirgin günlük dalgalanmalar göstermediği ve sentezinde fotoperiyod etkisinin çok az olduğu kabul edilmektedir. Pinealektomi uygulanmış hayvanlarla yapılan çalışmalar GİS'teki melatonin içeriğinin epifiz bezinden bağımsız olduğunu gösterse de bazı çalışmalar bağırsaklarda az miktarda melatoninin epifiz bezinden kaynaklanabileceğini göstermiştir^{129,135,136}.

Gıda alımı ve içeriği GİS'teki melatonin içeriğinin ve sentezinin ana düzenleyicilerinden biridir. Birçok çalışmada gıda alımıyla birlikte GİS'te melatonin üretiminin arttığı gösterilmiştir¹³⁷. Diğer yandan açlıkta da GİS'te melatonin

düzeylerinin arttığı gösterilmiştir¹³⁸. Ayrıca gıda kısıtlaması uygulanan deney hayvanlarında melatonin seviyelerinin epifiz bezinde düşerken serumda arttığı gözlemlenmiştir^{139,140} ve açlıkta artan serum melatonin seviyeleri GİS ile ilişkilendirilmiştir⁹. GİS'te yemekle birlikte artan melatoninin sindirim sürecinde bir zamanlayıcı olarak rol oynayabileceği, açlık sırasında artan melatoninin ise gıda geçiş süresini uzatarak emilimi arttırabileceği ve serbest oksijen radikallerinin detoksifiye edilmesine yardımcı olabileceği öne sürülmüştür¹⁴¹. Birçok besinin melatonin ve melatonin prekürsörü triptofan içerdiği^{142,143} ve beslenme içeriğinin serum ve GİS melatonin seviyelerini değiştirdiği gösterilmiştir^{131,132,144}. Gıda zamanlamasının yanında alınan gıda içeriğinin de hem sistemik hem de GİS'teki melatonin seviyeleri üzerinde belirleyici olduğu kabul edilmektedir¹⁴⁵.

GİS'teki melatonin konsantrasyonu yaşla değişiklik gösterebilir, ancak yaş ile GİS melatonin seviyeleri arasındaki ilişki tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda yaşlanmayla birlikte GİS melatonin seviyelerinin düştüğünü, bazı çalışmalarda ise yükseldiği gösterilmiştir^{116,146,147}.

3.3.2. Melatonin reseptörleri

Keşfinden sonraki uzun yıllar boyunca melatoninin eylemlerini sınırlı sayıda hücrede (MSS hücreleri) reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirdiği varsayılmıştır. İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalarla melatonin için farklı bağlanma bölgeleri tanımlanmış ve farklı dokularda melatonin reseptörleri gösterilmiştir.

İlk yıllarda melatonin reseptörleri farmakolojik özelliklerine göre Mel1A, Mel1B ve Mel1C olarak sınıflandırılmıştır. Bunlardan ikisi, Mel1A ve Mel1B, yakın zamanda MT1 ve MT2 reseptörleri olarak yeniden adlandırılmıştır. Bu reseptörler G-protein-bağlı reseptör ailesine üye transmembran reseptörlerdir ve aminoasit düzeyinde yüksek homoloji gösterirler. Membran reseptörleri birçok memeli türünde SSS, GİS, akciğer, kardiyovasküler sistem (kardiyak ventrikül duvarı, aorta, koroner ve serebral arterler), üreme sistemi (miyometriyum, granüloza ve luteal hücreler), meme dokusu, yağ dokusu, böbrekler, adrenal bezler, trombositler ve bağışıklık sistemi hücreleri (nötrofiller, lenfositler, makrofajlar) gibi farklı doku ve hücrelerde tanımlanmıştır⁶. Ayrıca insanlarda farklı kanser hücrelerinde melatonin reseptör

ekspresyonu gösterilmiştir ve bu keşif melatoninin onkostatik etkilerini desteklemektedir^{114,148-151}. Bazı hücrelerin sitozolünde MT3 olarak adlandırılan bir bağlanma bölgesi tanımlanmıştır. Bu bağlanma bölgesi ksenobiyotik metabolizması ile ilgili olan kinon redüktaz 2 (QR2) enziminin üzerinde olduğu gösterilmiştir^{152,153}.

Melatoninin hücre çekirdeğinde retinoik asit reseptörü süper ailesine ait olan retinoid yetim reseptörlerine (ROR) ve retinoid Z reseptörlerine (RZR) bağlandığı gösterilmiştir. Bu nükleer reseptörler arasında $ROR\alpha$, $RZR\alpha$, $ROR\alpha2$ ve $RZR\beta$ bulunur^{152,154,155}. $ROR\alpha$ alt tipi lenfositler, nötrofiller ve monositler gibi bağışıklık sisteminin hücrelerinde belirgin olmakla birlikte bugüne kadar test edilen tüm memeli dokularında tespit edilmiştir^{154,156,157}. Melatoninin hücre iskeletinin düzenlenmesinde ve nükleer reseptörlerin kontrolünde yer alan kalsiyum bağlayıcı proteinler, kalmodulin ve kalretikulin ile etkileşime girdiği gösterilmiştir^{158,159}. Son olarak melatoninin apoptozun düzenlenmesi ile ilişkili olduğu düşünülen iki mitokondriyal bağlanma bölgesi gösterilmiştir^{160,161}.

3.3.2.1. Luzindol

1988 yılında Dubocovich tarafından luzindolün tavşan retinasında melatonin reseptör bölgeleri için melatoninle yarıştığı gösterilmiştir¹⁶². Daha sonra luzindolün hem MT1 hem de MT2 reseptörlerini antagonize ettiği gösterilmiştir¹⁶³. Genel anlamda melatonin reseptör blokajı ile melatoninin anti-inflamatuar etkilerini ortadan kaldırdığı bilinse de luzindolün bazı koşullarda inflamatuvar hasarı hafiflettiği bildirilmiştir¹⁶⁴. Ayrıca antidepresan etkilere sahip olduğu da gösterilmiştir¹⁶⁵.

3.3.3. Melatonin işlevleri

Melatoninin birincil fonksiyonları, sentez yeri, reseptörlerinin dağılımı ve hedef organlardaki diğer bağlanma bölgeleri, lokal dinamikler ve hedef hücrelere özgü farklılıklar göz önüne alınarak geniş bir perspektifte değerlendirilmektedir. Ayrıca diğer hormonları, nörotransmitterleri ve sinyal moleküllerini etkileyerek çok sayıda ikincil etkilere neden olmaktadır⁶.

3.3.3.1. Melatoninin santral sinir sistemindeki etkileri

MSS’de melatonin ilgili ligandlarına farklı yollarla ulaşabilir. Primer olarak epifiz bezinde üretilen melatonin santal sinir sisteminde yayılır ve işlev gösterir¹⁶⁶. Bununla birlikte epifiz bezi dışında MSS’nin diğer bölgelerinde de melatonin sentezlenebileceği bildirilmiştir^{167,168}. Lipofilik özelliği sayesinde dolaşımdaki melatonin kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçer, ancak dolaşımdaki melatoninin MSS’deki fizyolojik konsantrasyonlara ne derecede katkıda bulunduğu tam olarak anlaşılamamıştır. Melatonin reseptörleri epifiz bezi de dahil olmak üzere MSS’de yaygın olarak eksprese edilir (SKN, pars tuberalis, prefrontal korteks, serebellar korteks, hipokampus, bazal ganglionlar, substantia nigra, ventral tegmental alan, nükleus akkumbens ve retina).

Melatonin SKN’deki etkileri en önemli ilgi alanı olmuştur; uyku/uyanıklık, mood, vücut sıcaklığı, glukokortikoid ritmi gibi birçok vücut fonksiyonunun zamanlamasını içeren sirkadiyen ritim ve mevsimsel üreme davranışlarının düzenlenmesi primer işlevleri olarak kabul edilmektedir¹⁶⁹. Hipotalamus-hipofiz-adrenal aksta melatonin reseptörlerinin eksprese edildiği ve melatoninin glukokortikoid sekresyonunu modüle ettiği gösterilmiştir^{170,171}. Melatoninin bu işlevlere ek olarak y-aminobütirik asit (GABA) ve glutamat reseptörlerini modüle ederek yatıştırıcı ve anti-konvülzan etkiler gösterdiği bildirilmiştir^{172,173}. Bu anti-eksitator etkilerin aynı zamanda anksiyolitik, anti-hiperaljezik ve anti-nosiseptif etkilerle de ilişkili olabileceği düşünülmektedir¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Melatoninin anksiyolitik ve analjezik etkisi literatürde birçok çalışmada kanıtlanmıştır¹³⁻¹⁵. Hipokampusta bulunan melatonin reseptörlerinin öğrenme ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca yapılan in vitro çalışmalar ile Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejenaratif bozukluklarda gösterilen melatonin reseptör kayıpları melatoninin nöroprotektif etkilerini desteklemektedir¹⁷⁷⁻¹⁸⁰.

3.3.3.2. Melatoninin gastrointestinal sistem üzerine etkileri

Melatonin, GİS’te mukozal enterokromaffin hücrelerde üretilir ve lipofilik özelliği sayesinde muskularis mukozaya, submukozaya, düz kas hücrelerine, miyenterik pleksusa ve dolaşıma taşınabilir. Bu sayede inta-, oto- ve parakrin etkiler gösterir. Motilitenin düzenlenmesinde, immün yanıtın düzenlenmesinde, sekresyonların ve bazı peptidlerin salgısının düzenlenmesinde rol oynar¹⁸¹. Bazı patofizyolojik durumlarda melatoninin mukozal kan akımını arttırdığı, antioksidan ve antiinflamatuvar etki

göstererek GİS'te koruyucu rol oynadığı bilinmektedir^{141,182}. Ayrıca melatoninin mikrobiyota üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir.

Melatoninin GİS'te kasılma ve gevşeme üzerine etkileri birçok çalışmada raporlanmıştır. Bu etkilerini temel olarak düz kas hücrelerinde bulunan reseptörlerine (MT2) bağlanarak gerçekleştirir. Melatoninin düşük dozlarda bağırsak geçişini hızlandırırken yüksek dozlarda bu etkiyi tersine çevirdiği gösterilmiştir¹⁷. Erken in vitro araştırmalar melatoninin sıçan ileumunda ve kolonunda spontan kasılmaların gücünü azalttığını göstermiştir¹⁸. İnsanlarla yapılan bir çalışmada melatonin verilmesinin kolon transit zamanını uzattığı gösterilmiştir¹⁸³. Melatoninin, serotonin reseptörlerini (5-HT₃) antagonize ederek ve bağırsakta bir serotonin taşıyıcı aktivitesini inhibe ederek düz kas hücrelerindeki gevşetici etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır^{19,184}. Melatoninin, kolesistokinin etkisiyle ileal düz kas hücrelerinde meydana gelen uyarılmayı azalttığı ve ayrıca vagal afferent lifler üzerindeki kolesistokinin (CCK2) reseptörleri ile etkileşerek vago-vagal inhibe edici refleksi uyararak mide boşalma hızını yavaşlattığı bildirilmiştir^{185,186}. Barajas-Lopez ve arkadaşları melatoninin bağırsak düz kasları üzerindeki doğrudan etkilerinin yanında miyenterik sinir sistemi aracılığıyla da motilite üzerinde etkili olabileceğini göstermiştir. Bu etkinin melatoninin nikotinik kanallar ve/veya Ca⁺² bağımlı K⁺ kanalları ile etkileşerek meydana geldiği öne sürülmüştür^{187,188}. Melatonin düz kaslarda oluşturduğu gevşeme ile mukozal kanlanmayı artırarak iskemi ve ülserle karşı koruyucu etki gösterir. Son olarak melatoninin antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri aracılığıyla inflamasyonla indüklenen motilite bozukluklarını tersine çevirebileceği bildirilmiştir¹⁸⁹.

Melatonin GİS'te sekresyonların ve salgıların düzenlenmesinde rol alır. Bağırsaklarda iyon ve elektrolitlerin transmembran taşınmasında rol aldığı olduğu düşünülmektedir¹⁹⁰⁻¹⁹³. Fekal su içeriğinin düzenlenmesi ile ilişkilidir¹⁴¹. Duodenal bikarbonat sekresyonunun güçlü bir uyarıcısı olduğu ve bu etkinin melatoninin reseptör blokajı ile ortadan kalktığı gösterilmiştir¹⁹⁴. Ayrıca endokrin ve ekzokrin pankreas fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar. Melatonin öncüsü triptofanın akut pankreatite karşı koruyucu olduğu ve melatoninin pankreatit şiddetini azalttığı gösterilmiştir^{195,196}. Ayrıca tip 2 diyabetik sıçanlarda melatonin verilmesi hiperinsülinemiye azaltmış ve lipit metabolizmasını iyileştirmiştir¹⁹⁷.

Melatonin GİS'te mitotik aktivite üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Literatürde bu konu ile ilgili karşıt görüşler bulunmakla birlikte melatoninin bağırsak epitelindeki mitotik aktivite üzerindeki etkisinin doz ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Melatoninin sıçanların jejunumunda proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir¹⁹⁸. Callaghan ve arkadaşları pinealektomi yapılan sıçanların bağırsak epitelinde mitotik aktivitenin arttığını bildirilmiştir¹⁹⁹. Diğer yandan Pawlikowski ve arkadaşları tarafından yapılan pinealektomi sonrası GİS'te hücre proliferasyonunda artış saptanmıştır²⁰⁰. Benzer şekilde melatonin enjeksiyonu yapılan farelerde duodenum epitelinin proliferasyonunda artış izlenmiş ve deneysel kolit yapılan farelere uygulanan intraperitoneal melatoninin goblet hücrelerinin rejenerasyonunu arttırdığı gösterilmiştir^{201,202}. Düşük melatonin dozları farelerde jejunal proliferasyonu azaltırken yüksek dozların arttırdığı gösterilmiştir^{200,203}.

3.3.3.3. Melatoninin immün modülatör etkileri

Monositler, eozinofiller, mast hücreleri, T-lenfositler, NK hücreleri, kemik iliği hücreleri, timostler ve çeşitli lökosit kaynaklı hücre dizileri dahil olmak bağırsaklık sisteminin birçok hücresinin melatonin sentezi yaptığı ve melatonin reseptörleri eksprese ettiği bildirilmiştir²⁰⁴⁻²⁰⁷. Özellikle MT1 ve ROR α reseptörlerinin lenfositler üzerindeki ifadeleri arasındaki pozitif korelasyon ve uyumlu etkileri dikkat çekmektedir²⁰⁸. Melatoninin immün sistem üzerindeki etkisi çok sayıda sitokin ve hücreyi içeren kompleks bir süreçtir. Melatonin, anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar olmak üzere iki yönlü etki gösterir ve bu etkiler farklı koşullar altında ortaya çıkmaktadır.

Melatonin lenf düğümlerinde CD4 lenfositlerini artırır, CD8 lenfositlerini azaltır²⁰⁹. T-helper hücrelerinde ve monositlerde IL-2, IL-6 ve IFN γ üretimini uyarır, ayrıca PGE2'nin IL-2 üzerindeki negatif etkilerini geri çevirir^{208,210}. Monositlerden IL-1, IL-12, TNF α ve M-CSF salgısının uyarabilir²¹¹. Melatonin aynı zamanda T lenfositlerinin antijen sunan hücrelerle (ASH) etkileşimiyle de ilgilidir. ASH'de MHC sınıf II moleküllerinin ve TGF β 'nin ekspresyonunu teşvik eder ve IL-12 yoluyla T hücresi farklılaşmasını ve büyümesini Th-1 lehine etkiler²¹². Th1 farklılaşmasının yanında melatoninin bazı çalışmalarda Th2 yanıtını uyarırken bazılarında baskıladığı gösterilmiştir^{213,214}.

Bakteriyel LPS kullanılarak yapılan deneylerde melatoninin anti-inflamatuar etki gösterdiği, özellikle pro-inflamatuar bir sitokin olan TNF α 'yı baskıladığı bildirilmiştir^{215,216}. Ayrıca melatonin, mononükleer hücrelerde LPS ile indüklenen sitokinlerin ve kemokinlerin salınımını inhibe eder²¹⁷. Septik şok, karaciğer hasarı ve yaşlanma oluşturulan deneysel modellerde melatoninin IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-12 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin düzeyini azalttığı gibi anti-inflamatuar sitokinlerin düzeyini arttırdığı gösterilmiştir²¹⁸. Melatoninin 5-lipooksijenaz aktivitesini, melatonin metaboliti AFMK ve AMK'nın makrofajlarda siklooksijenaz aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir^{219,220}. PGE2'yi direk antagonize etmesi ve prostaglandin sentezi üzerindeki inhibe edici etkileri melatoninin anti-inflamatuar etkilerine katkıda bulunmaktadır^{210,221}. Nitrik oksit (NO) inflammatuar kaskadın çeşitli bölümlerini etkileyen anahtar bir moleküldür ve vücutta nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile sentezlenir. Melatoninin NOS üzerinde düzenleyici etki göstererek anti-inflamatuar ve sitoprotektif etkiler gösterir²¹⁸. Ayrıca melatoninin inflammatuar süreçte önemli rol oynadığı bilinen endotelial adhezyon moleküllerini (ICAM-1, VCAM-1, selektinler)^{222,223}, C-reaktif protein (CRP) salınımını²²⁴ ve hücrel sinyal yollarını (NF κ B yolu)²²⁵ inhibe ettiği gösterilmiştir.

3.3.3.4. Melatoninin antioksidan ve sitoprotektif etkileri

Melatoninin doğrudan serbest radikalleri yakalama aktivitesi yaklaşık 30 yıldır bilinmektedir²²⁶. Doğrudan serbest radikal temizleyici olarak keşfinden kısa süre sonra glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz gibi anti-oksitatif enzimleri indüklediği, ayrıca glutasyon sentezini arttırdığı gösterilmiştir^{227,228}. Melatonin oksidatif hasarın yanında nitrozatif hasara karşı da koruyucudur. Nitrojen bazlı toksik maddeler olan nitrik oksit ve peroksinitrit anyonunu nötralize ettiği ve pro-oksitatif enzim olan NOS'u baskıladığı bulunmuştur²²⁹⁻²³¹. Melatoninin farmakolojik dozlarının yanında fizyolojik düzeylerinin de serbest radikallere karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir²³². Ayrıca melatonin metabolitleri c3OHM, AMK ve AFMK'nın da serbest radikal temizlenmesinde işlev gördüğü kanıtlanmıştır²³³.

Aerobik hücrelerde ATP sentezinin büyük bölümünü üstlenen mitokondri bu temel görevi esnasında reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin üretilmesinden sorumludur. Bu serbest radikaller elektron transport zincirinde (ETC) elektron sızıntılarına, enerji verimliliğinde azalmaya ve mitokondriyal işlev bozukluklarına

neden olmaktadır²³⁴. Mitokondriyal patofizyolojik mekanizmalarla birlikte mitokondrinin yaşlanma üzerindeki rolünün anlaşılması ve çok sayıda mitokondriyal hastalığın farkındalığı, ironik bir şekilde mitokondrinin bir "hastalık güç merkezi" olarak tanımlanmasına yol açmıştır²³⁵. Melatoninin, farmakolojik dozlarda reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin mitokondriyal oluşumunu azalttığı, ETC proteinlerinin oksidatif ve nitrozatif hasarına ve ayrıca iç zardaki lipid peroksidasyonuna karşı koruduğu, elektron akışını desteklediği ve enerji verimliliğini arttırdığı gösterilmiştir^{236,237}. Melatoninin serbest radikal temizleme etkisine katkıda bulunan diğer bir önemli eylem de ağır metalleri bağlama yeteneğidir. Melatoninin konsantrasyon bağımlı olarak alüminyum, kadmiyum, bakır, demir, kurşun ve çinkoyu bağladığını bildirmiştir²³⁸.

Melatonin ve metabolitleri serbest radikal süpürücü ve antioksidan etkileriyle normal hücrelerin proliferasyonunu sürdürür ve apoptoz aracılı hücre dejenerasyonunu önler. Bu sitoprotektif etki oksidotoksinlere maruz kalma, iskemi/reperfüzyon, travma, iyonlaştırıcı radyasyon, proapoptotik ve proinflamatuvar sinyal oluşturucu tedaviler verilen deneylerde birçok dokuda incelenmiş ve kanıtlanmıştır²³⁹⁻²⁴³.

3.3.3.5. Melatoninin diğer sistem ve dokulardaki etkileri

Melatonin ve melatonin reseptörlerinin periferik dokulardaki varlığı gösterilmiş olsa da birçok yerdeki işlevi tam olarak anlaşılammıştır ve araştırılmaya devam etmektedir. İnsan kahverengi yağ dokusunda uzun süreli melatonin maruziyetinden sonra GLUT4 ekspresyonunun azaldığı ortaya konmuştur. Bu bulgu melatoninin obezite ile mücadele potansiyeli açısından değerlendirilebilir^{244,245}. Melatonin miyometrum düz kas hücrelerinde oksitosin ile sinerjistik etki gösterdiği bildirilmiştir²⁴⁶. Kardiyak ventriküllerde melatonin reseptörlerinin varlığına rağmen işlevi tam olarak aydınlatılamamıştır²⁴⁷. Vasküler sistemde MT1 reseptörlerinin uyarılması vazokonstrüksiyon, MT2 reseptörlerinin uyarılmasını vazodilatasyonla sonuçlandığı gösterilmiştir²⁴⁸. Anti-kanser etkisi melatoninin önemli işlevlerinden biri olarak sayılabilir. Daha önce birçok çalışmada farklı orjinli kanser hücrelerinin melatonin reseptörleri eksprese ettiği ve melatonin antikanserojen etkileri gösterilmiştir^{114,148,149,151,249,250}.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Deney Hayvanları ve Deneysel Tasarım

Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından 09.01.2021 tarihinde 94.2021.mar protokol kodu ile onaylanan projede deney basamakları Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deneyde gerçekleştirilen uygulamalar "Laboratuvar Hayvanları Kullanımı ve Bakımı Kılavuzu"na uygun olarak yapıldı.

İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden 56 adet erkek Sprague Dawley sıçan temin edildi. Menstürel siklus boyunca farklılık gösteren hormon düzeyleri gastrointestinal sistem fizyolojisini etkileyeceği için çalışma için dişi sıçanlar tercih edilmedi. On iki ile on dört haftalık olan erkek sıçanların ağırlıkları ortalama 335 gr olarak ölçüldü. Deney sürecinde sıçanların, sıcaklığı $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, nem oranı % 65-70 olan ortamda ve bir kafeste en fazla dört hayvan olacak şekilde barınmaları sağlandı. Deney süresince sıçanlar standart sıçan yemi ile beslendi, su ve yem erişimleri ad libitum olarak düzenlendi. Sıçanlar iki hafta süresince laboratuvar koşullarına alıştırdıldıktan sonra deney protokolüne uygun olarak gruplara ayrıldı. Sıçanlar deney gruplarına göre 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık döngüsü olan veya 24 saat aydınlık olan ortamda takip edildi.

Normal 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık (12/12) siklusunda barındırılan ve abdominal cerrahi yapılan gruplar (n=24), rastgele olarak 3 gruba ayrılıp taşıyıcı, melatonin veya melatonin + luzindol tedavileri cilt altına verildi. Cerrahiden 24 saat önce 24 saat aydınlık (24/0) siklusuna alınan sıçanlar (n=24) abdominal cerrahi sonrasında rastgele olarak 3 gruba ayrılıp taşıyıcı, melatonin veya melatonin + luzindol tedavileri verildi ve deney sonuna kadar 24/0 siklusunda barındırıldı. Kontrol grubu ise 12/12 siklusunda barındırıldı ve taklit cerrahisi (sham cerrahi; n=8) yapıldı.

Tablo 1. Deney grupları

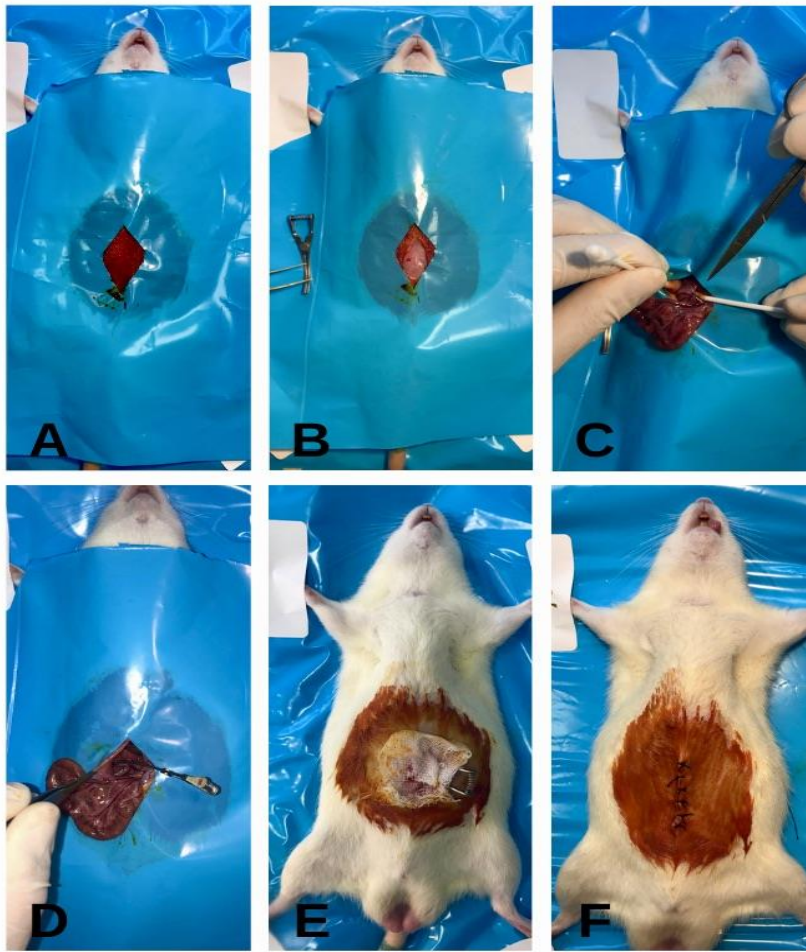
DENEY GRUPLARI	Tedaviler	Erkek Sıçanlar (n =56)
Kontrol grubu: 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık (12/12) ışık döngüsü + taklit cerrahi	Cilt altına (s.c.) taşıyıcı enjeksiyonu: %5 etanol içeren serum fizyolojik (E+SF; 1 ml/kg/gün)	8
12/12 ışık döngüsü + abdominal cerrahi grupları	Taşıyıcı: E+SF (1 ml/kg/gün s.c.)	8
	Melatonin (10 mg/kg/gün s.c.)	8
	Melatonin (10 mg/kg/gün s.c.) + Luzindol (0,25 mg/kg/gün s.c.)	8
24/0 ışık döngüsü + abdominal cerrahi grupları	Taşıyıcı: E+SF (1 ml/kg/gün s.c.)	8
	Melatonin (10 mg/kg/gün s.c.)	8
	Melatonin (10 mg/kg/gün s.c.) + Luzindol (0,25 mg/kg/gün s.c.)	8

4.2. Abdominal Cerrahi Modeli, Işık Protokolü ve Tedaviler

Işık döngüsü 24/0 olarak değiştirilecek deney gruplarında (n=24) cerrahi girişimden 24 saat önce ışık protokolü başlatıldı. Tüm deney grupları, cerrahi öncesi 16 saat suya erişimleri serbest olacak şekilde aç bırakıldı.

İntraperitoneal (i.p.) olarak uygulanan ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (10mg/kg) anestezisi altında karın bölgesi tıraş edildi ve %10 povidion iyot ile cilt dezenfeksiyonu sağlandı. Anestezi derinliği parmak kısırtma testi ile kontrol edildikten sonra umblikus üzeri orta hat insizyonu ile karınları açıldı. Karın ön duvarı her iki yana ekartör aracılığı ile açıldıktan sonra sağ kolon ve ince bağırsaklar sola ekarte edildi ve süperior mezenterik arter (SMA) ve süperior mezenterik ven (SMV) izole edildi. SMA travmatik mikroklempler ile oklüde edildi. Yirmi dakikalık iskemik periyodun sonunda klempler açılıp reperfüzyon sağlandı. Tekrar kan akımının sağlanmasıyla birlikte intestinal anslardaki renk değişikliği gözlemlendikten sonra

bağırsaklar karın içerisine yerleştirilecek ve karın ön duvarı katları usulüne uygun şekilde kapatıldı^{3,251}. Sham cerrahi uygulanan sıçanlar için aynı preoperatif hazırlıklar yapıldıktan sonra umblikus üzeri orta hat insizyonu yapıldı. İntraabdominal yapılara manipüle edilmeden karın 20 dakika açık bırakıldı. Yirmi dakikalık bekleme süresinin ardından karın ön duvar katları usulüne uygun şekilde kapatıldı. Tüm gruplarda cerrahi sonrası sıvı kaybını karşılamak için sıçanlara %0,9 NaCl (10 ml/kg, s.c.) enjeksiyonu yapıldı. Isı kaybını önlemek için sıçanlar işlem süresince vücut sıcaklığında ısıtıcı battaniye üzerinde takip edildi ve cerrahi sonrası 1 saatlik derlenme süresinin ardından kafeslerine yerleştirildi.



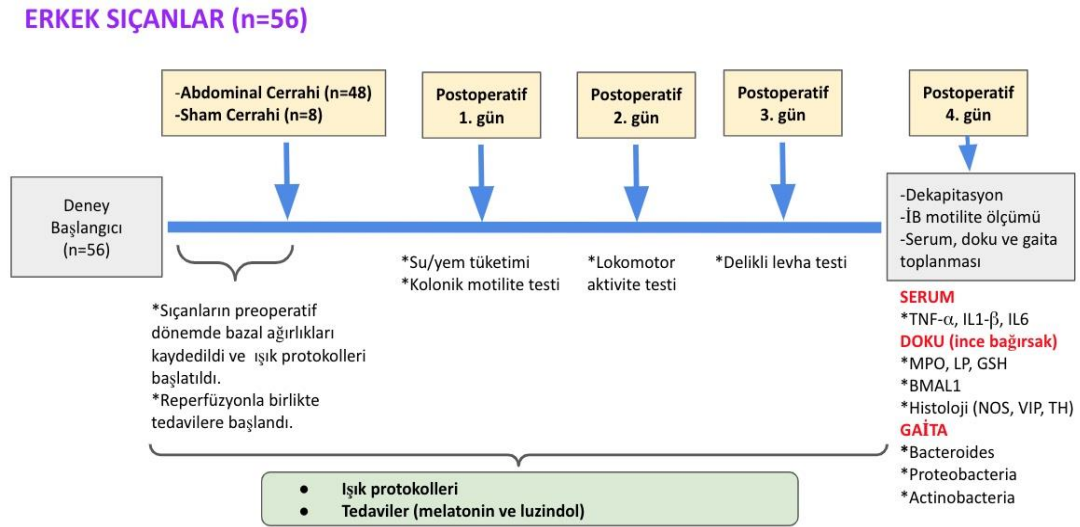
Şekil 3. Cerrahi prosedür

Cerrahi alanın hazırlığı, kılların tıraş edilmesi, cilt antisepsisi ve örtüm (A), Laparotomi (B), SMA ve SMV'nin izole edilmesi (C), SMA'nın klemplmesi (D), 20 dakikalık iskemi süresi (E), Revaskülarizasyon ve batının kapatılması (F).

4.2.1. Tedaviler

Toz halinde alınan melatonin (Sigma-Aldrich, Cat. No. M5250-1G) %5'lik etanol içerisinde çözdürüldükten sonra %0,9 NaCl çözeltisi ile seyreltilerek 10 mg/ml derişime getirildi. Toz halinde alınan luzindol (Sigma-Aldrich, Cat. No. L2407) dimetil-sülfoksit (DMSO, Sigma) içerisinde çözdürüldükten sonra %0,9 NaCl çözeltisi ile seyreltilerek 0,25 mg/ml derişime getirildi. Tedavi uygulanmayacak gruplar için taşıyıcı olarak %5'lik etanol çözeltisi (E+SF) hazırlandı.

Kontrol grubuna cerrahi bitiminde ve postoperatif 24. saat, 48. saat ve 72. saatte taşıyıcı olarak %5 etanol içeren serum fizyolojik (E+SF; 1 ml/kg/gün s.c.) enjeksiyonları yapıldı. Abdominal cerrahi yapılan hem 12/12 hem de 24/0 ışık döngüsündeki sıçanlara reperfüzyonun hemen ardından ve postoperatif 24. saat, 48. saat ve 72. saatte E+SF veya melatonin (10 ml/kg/gün, s.c.) veya melatonin ve luzindol (10 ml/kg/gün ve 0,25 mg/kg/gün s.c.) enjeksiyonları yapıldı.



Şekil 4. Deney protokolü

4.3. Davranış Deneyleri

Ameliyat sonrası iyileşme sürecini değerlendirmek için sıçanların günlük ağırlık takibi, postoperatif 1. gün yem-su tüketimleri ve kolonik motilite ölçümü, postoperatif 2. gün lokomotor aktivite ölçümü ve postoperatif 3. gün anksiyete düzeylerini değerlendirmek için delikli levha testi yapıldı.

4.3.1. Ağırlık takibi

Operasyon günü anestezi verilmeden önce başlanılarak deney süresince sıçanların vücut ağırlıkları (gr) günlük olarak ölçülerek kaydedildi. Ardışık günler arasındaki ağırlık değişimi sıçanların kilosuna oranlanarak yüzde cinsinden ifade edildi.

4.3.2. Yem/su tüketimi ölçümü ve kolonik motilite testi

Sıçanlar, postoperatif 1. gün su alımı serbest olacak şekilde 5 saatlik aç bırakıldıktan sonra yem ve su miktarı belirli 38x30x25 cm pleksiglas altı ızgaralı gözlem kutularına birer birer yerleştirildi. On altı saatlik takip sonrasında kafeslerde kalan yem ve su miktarları ölçülerek her sıçan için yem ve su tüketimleri hesaplandı. Ayrıca kafesin altında biriken fekal peletler toplanıp tartılarak sıçanların postoperatif 1. gün kolon motiliteleri değerlendirildi.

4.3.3. Lokomotor aktivitenin değerlendirilmesi

Oluşturulan abdominal cerrahi modelinde gruplar arasında genel lokomotor hareketlilikte fark olup olmadığının ortaya konması amacıyla, postoperatif 2. günde sıçanlar 40x40x40cm boyutlarındaki lokomotor aktivitemetri kafesine (Commat ACT-508 marka) yerleştirilerek lokomotor hareketlilikleri ölçüldü. Sıçanların 5 dakika içerisinde yatay ve dikey düzlemde tüm hareket süreleri ve MS Office Excel yazılımı aracılığıyla çıktı alınarak kaydedildi. Elde edilen verilerden vertikal ve horizontal aktivite sayıları, santimetre cinsinden kat edilen uzaklık ve saniye cinsinden hareketli geçirdiği süre ölçülerek kaydedildi²⁵².

4.3.4. Anksiyete düzeyinin değerlendirilmesi, delikli levha testi

Oluşturulan abdominal cerrahi modelinde grupların anksiyete düzeyleri arasında fark olup olmadığı araştırıldı. Anksiyete düzeyi arttığında azalan keşfedici davranışları araştırmak için delikli levha testi kullanıldı. Postoperatif 3. günde sıçanlar delikli tahta aparat (100x100x50 cm boyutlarında, eşit aralıklarda, 3,8 cm çapında 16 deliği olan ahşap bir kutu) içerisine konularak 5 dakika boyunca kutuyu serbestçe keşfetmelerine izin verildi ve bu davranışlar video kamera ile 5 dakika boyunca kaydedildi. Kayıtlar kör bir araştırmacı tarafından değerlendirilerek sıçanların delikten bakma sayıları,

şahlanma sayıları ve donma süreleri kaydedildi. Sıçanların hareketsiz kaldığı süreler (5 dakikadaki yüzdesi), azalmış delikten bakma ve azalmış şahlanma sayıları artmış anksiyete davranışı olarak değerlendirildi²⁵³.

4.4. İnce Bağırsak Motilite Ölçümü

Postoperatif 4. gün sonunda, 96. saatten 30 dakika önce arap sakızı (Sigma-Aldrich, Cat. No. G9752) ve aktif kömür (Sigma-Aldrich, Cat. No. 902470) karışımı (20 ml serum fizyolojik içinde 2,5 gr sakız ve 1,5 gr kömür ile hazırlanan) ısıtılarak (37 °C) polietilen bir kanül aracılığıyla orogastrik olarak uygulandı. Otuz dakika sonunda dekapite edilen sıçanlara laparotomi yapılarak bağırsakları mezenterden serbestleştirilerek çıkarıldı. Pilordan ve çekumdan klemplenen ince bağırsak dokusu, gerdirilmeden uzunlamasına bankoya yerleştirildi ve tüm bağırsak uzunluğu ile kömürün ilerlediği uzunluk kaydedildi. İnce bağırsak motilitesi, kömürün ilerlediği uzunluğun (cm) toplam bağırsak uzunluğuna (cm) bölünmesi ile yüzde cinsinden ifade edildi (transit indeksi)²⁵⁴.

4.5. Serum, Doku ve Gaita Örneklerinin Toplanması

Orogastrik aktif kömür ve arap sakızı uygulamasından 30 dakika sonra dekapite edilen sıçanların gövde kanı sarı kapaklı separatör jelli tüplere alındı ve elde edilen kanlar 4°C sıcaklıkta 3000g ile 15 dakika boyunca santrifüj edilerek serum örnekleri elde edildi. Elde edilen serumlarda sistemik inflamatuvar yanıtın göstergesi olarak Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeyleri ölçülmek üzere -20°C’de saklandı.

Sakrifiye edilen sıçanlarda laparotomi ile ince bağırsak mezenterinden serbestleştirilerek ayrıldı. İnce bağırsak motilitesi hesaplandıktan sonra pilorun 30 cm distalinden 20 cm ince bağırsak dokusu çıkarıldı. Çıkarılan ince bağırsak dokusu %0,9 NaCl ile yıkandıktan sonra beş eşit parçaya bölündü. Birinci parça PCR (polymerase chain reaction) yöntemi ile BMAL1 gen ekspresyon analizi yapılmak üzere -80°C’de saklandı. İkinci parça %10 tamponize formaldehit ile fikse edildikten sonra konvansiyonel histopatolojik değerlendirme ve immünohistokimyal incelemeler [tirozin hidroksilaz (TH), vazoaaktif intestinal peptit (VIP) ve nitrik oksit sentaz (nNOS)] için oda sıcaklığında saklandı. Üçüncü parça, dokuda nötrofil göçünün göstergesi olarak miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ölçülmek üzere -20°C’de

saklandı. Dördüncü parça, dokuda oksidan hasarın göstergesi olarak lipit peroksidasyonu ve glutasyon (GSH) düzeyleri ölçülmek üzere -20°C’de saklandı. Beşinci parça, kemilüminesans yöntemiyle reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) düzeylerini ölçülmek üzere -20°C’de saklandı.

İnce bağırsak dokusunun toplanmasının ardından deney grupları arasındaki mikrobiyota değişikliklerini değerlendirmek üzere sıçanların rektumundan steril koşullarda gaita örnekleri alındı. Alınan örnekler steril eppendorflarda PCR yöntemi ile *Bacteroides*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* suşlarındaki değişimler hesaplanmak üzere -80°C’de saklandı.

4.5.1. Serumda sitokin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) düzeylerinin ELISA yöntemi ile ölçülmesi

Sıçanlar sakrifiye edildikten sonra -20 °C’de depolanan serum örneklerinde sistemik inflamatuvar yanıtın göstergesi olarak TNF- α , IL-1 β , IL-6 düzeyleri ölçüldü. ELISA (enzyme linked immuno assay), bir maddenin serum ya da doku homojenatı gibi örneklerde enzim bağlı antikorlar aracılığı ile ölçülmesine dayalı yaygın olarak kullanılan bir laboratuvar tekniğidir²⁵⁵. Serumda TNF- α (AFG Bioscience, Cat. No. EK720127), IL-1 β (AFG Bioscience, Cat. No. EK720260), IL-6 (AFG Bioscience, Cat. No. EK720267) düzeyleri ölçümü üretici firma yönergeleri takip edilerek ticari kitler ile prosedürüne uygun olarak yapıldı.

4.5.2. İnce bağırsak dokularında BMAL1 gen ekspresyon analizi

BMAL1 ve CLOCK gibi transkripsiyon faktörleri Period (PER) ve Cryptochrome (CRY) gibi sirkadyen ritmin kontrolünde önemli role sahip olan genlerinin transkripte olmasını sağlamaktadır^{25,26}. Daha önce yapılan çalışmalar gastrointestinal sistemin de kendi sirkadyen ritminin bulunduğunu göstermiştir. İntestinal rejenerasyon sırasında ritmik olarak eksprese olan sitokinlerin epitelde stres yanıtı oluşturduğu ve bu stres yanıtını regüle eden BMAL1’in intestinal epitelin 24 saat içindeki proliferasyonunu düzenlediği gösterilmiştir²⁷. Çalışmamızda ince barsak epitelinde eksprese edilen BMAL1 düzeylerinin postoperatif iyileşme sürecindeki değişimi ve potansiyel etkisi araştırıldı.

İnce bağırsak dokusundan RNA izolasyonu Ecotech EcoPure Total RNA Kit (Cat No: E2075) kullanılarak, kitin yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirildi. İzole edilip -80°C’de saklanan RNA’lardan cDNA sentezi, SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline, BIO-65053) yardımıyla kitin yönergelerine uygun olarak yapıldı. Elden edilen cDNA ürünleri gen *BMAL1* gen ekspresyon çalışmasına kadar -20°C’de saklandı. Elde edilen cDNA’lara 20 µl steril distile su ile seyreltme işlemi yapıldı. Liyofilize formda alınan BMAL1 ve GAPDH primerleri steril distile su ile sulandırılıp ana stok oluşturuldu ve -20 °C’de saklandı. SentiFAST SYBR No-ROX Kit (Bioline, Cat. No. BIO-98005) kullanılarak kitin yönergelerine uygun reaksiyon karışımı elde edildi. 96 kuyulu Real Time PCR plate’inin her bir kuyusuna hazırlanan karışımdan 15 µl dağıtılıp, daha sonra her bir kuyucuğa 5 µl cDNA eklendi. Hazırlanan plate Light Cyclers 480 RT-PCR cihazına yerleştirilerek döngü koşulları oluşturuldu ve analiz gerçekleştirildi.

4.5.3. İnce bağırsak dokularının histopatolojik değerlendirilmesi

Histolojik inceleme için %10 tamponize formaldehit ile fikse edilen ince bağırsak dokuları yükselen alkol serilerinden (70%, 90%, 96%, ve 100%) geçirildi, sonrasında ksilen ile şeffaflaştırıldı ve parafine gömüldü. Mikrotom yardımı ile yaklaşık 4 µm kalınlığındaki kesitler morfolojik değerlendirme ve histopatolojik semikantitatif analiz yapılmak üzere hematoksilin&ezin ile boyandı. Her kesitte birbirinin benzeri en az beş alan ışık mikroskopunda (Olympus Bx51, Tokyo, Japonya) değerlendirildi ve CCD kamera (Olympus DP 72, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı. Semikantitatif skorlama a) yüzey ve kript epitelinde hasar, b) villus yapısında hasar, c) inflamatuvar hücre infiltrasyonu kriterlerini içermiştir. Birbirinin benzeri en az 5 alanda histopatolojik skorlama yapıldı. Her kriter, 0: hasar yok, 1: hafif hasar, 2: orta düzeyde hasar, 3: ciddi düzeyde hasar olarak skorlandı²⁵⁶.

4.5.4. İnce bağırsak dokusunda miyeloperoksidaz aktivitesinin ölçümü

İnce bağırsak dokusunda miyeloperoksidaz (MPO) aktivite ölçümü için yaklaşık 0,25-0,3 gram ağırlığındaki doku örnekleri %0,5’lik heksadesiltrimetilamonyum bromür (HETAB) (50 mM potasyum fosfat tamponu içinde; pH:6) 10 kat sulandırılıp homojenize edildikten sonra 12000 devirde 10 dakika süreyle 4°C’de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet, aynı hacimde %0,5 derişimli HETAB

içeren 50 mM K₂HPO₄ ile yeniden homojenize edilerek o-dianisidin·2HCl (20 mg/ml) + H₂O₂ (20 mM) + pellet olacak şekilde oda ısısında (22±1°C) 3 dakika inkübe edildi, reaksiyon %2'lik sodyum azid (NaN₃) ile durdurulduktan sonra absorbans değerleri 460 nm'de okundu. MPO aktivitesi, odianizidin·2HCl'nin H₂O₂ bağımlı oksidasyonunun spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenerek, 37°C'de 460 nm absorbansta ölçüldü ve enzim aktivitesi U/gr olarak kaydedildi²⁵⁷.

4.5.5. İnce bağırsak dokusunda lipit peroksidasyonu ve glutatyon ölçümü

Oksidan hasarın işareti olan lipit peroksidasyon göstergesi malondialdehit (MDA) düzeyleri ve endojen antioksidan molekül glutatyon (GSH) düzeyleri ince bağırsak doku örneklerinde ölçüldü. İnce bağırsak dokuları ağırlıklarının 10 katı kadar %10 derişimli trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu ile Ultra Turrax marka doku homojenizatöründe homojenize edilip 3000 devirde 4°C'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatantlar ayrılıp 15000 devirde 8 dakika kadar daha santrifüj edildi ve MDA düzeyi spektrofotometrede 535 nm absorbansta okunarak nmol/gr/doku cinsinden ifade edildi. Glutatyon (GSH) ölçümü için modifiye Ellman yöntemi kullanılarak µmol/gr/doku cinsinden ölçüm yapıldı ve GSH miktarı spektrofotometrik olarak 412 nm'de okunarak kaydedildi²⁵⁸.

4.5.6. İnce bağırsak dokusunda kemilüminesans yöntemi ile reaktif oksijen türlerinin ölçümü

Kemilüminesans (KL) yöntemi, yarılanma ömrü mikro-saniyeler süren reaktif oksijen türlerinin spesifik problemler aracılığı ile ölçülebilir limitlere ulaşmasını sağlayan non-invazif bir yöntemdir. Bu amaçla alınan ince bağırsak dokuları dikkatli bir şekilde 10-15 mg'lık küçük parçalara ayrılarak, 2 mL PBS + HEPES (0.5 M PBS ve 20 mM HEPES) tamponu içeren sayım tüplerine aktarıldı. KL ölçümleri luminometrede (EG & G Berthold Junior LB 9509, Almanya) luminol ve lusigenin problemleri kullanılarak yapıldı. Lusigenin aracılı ölçüm ile süperoksit radikali saptanırken luminol aracılı ölçüm ile hidroksil, hidrojen peroksit, hipoklorit ve hidroperoksil radikalleri saptandı. Dokuların eklendiği tüplere luminol (Final: 0.2 mM) eklenerek, 1 dakikalık aralıklarla 5 dakika süreyle luminometrede ölçüm yapıldı. Ölçüm sonunda dokular sayım tüplerinden çıkarıldı, sıvıları filtre kağıdına emdirildikten sonra kuru ağırlıkları alındı. Sonuçlar eğri altı alan (AUC: Area Under Curve) hesaplanarak doku ağırlığına

orantılandı ve rlu/mg (relative light unite/mg doku ağırlığı) cinsinden ifade edildi^{259,260}.

4.5.7. Mikrobiyotanın değerlendirilmesi

Dışkıdan total bakteri DNA'sının elde etmek için kaynatma yöntemi kullanıldı. Bu amaçla 30 mg feçes örneği tartılıp mikrotüpe alınarak, 0.1 ml steril distile su içerisinde 5 dakika yüksek devirde karıştırılarak homojenizasyon sağlandı. Elde edilen süspansiyon 95°C kuru ısı bloğunda 15 dakika bekletildikten sonra 14000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatant çalışmada kullanıldı. DNA örnekleri çalışma zamanına kadar -20°C'de saklandı. Fekal mikrobiyotada yer alan farklı bakteri gruplarını saptamak için kantitatif Real-Time PCR (qPCR) kullanıldı²⁶¹. *Bacteroides*, *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* suşları bu yöntemle araştırılıp miktarları belirlendi. Tüm Real-Time qPCR reaksiyonları için GM SYBR qPCR Kit (Genemark, Taiwan) kullanıldı. PCR karışımı, toplam 20 µL hacim içerisinde, 1 µL fekal DNA ekstraktı, her bir primerden 200 nM olacak şekilde hazırlanacak ve reaksiyon RotorgeneQ (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) termal döngü cihazında gerçekleştirildikten sonra elde edilen ürünler termal döngü cihazının yazılımı ile analiz edildi. Analiz edilen bakteri gruplarının miktarlarındaki değişimler saptandı. Elde edilen bakteri miktarlarının log₁₀ değeri hesaplandıktan sonra istatistiksel analiz yapıldı.

4.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler MS Windows için GraphPad Prism versiyon 8.3.0 yazılımında (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com) değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata cinsinden ifade edildi. Birden çok grubun karşılaştırıldığı analizlerde parametrik dağılım gösteren veriler için ANOVA, non-parametrik dağılım gösteren veriler için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İki grubun karşılaştırıldığı analizlerde ise parametrik dağılım gösteren veriler için Student t-testi, non-parametrik dağılım gösteren veriler için Mann-Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için p değeri <0,05 olarak kabul edildi.

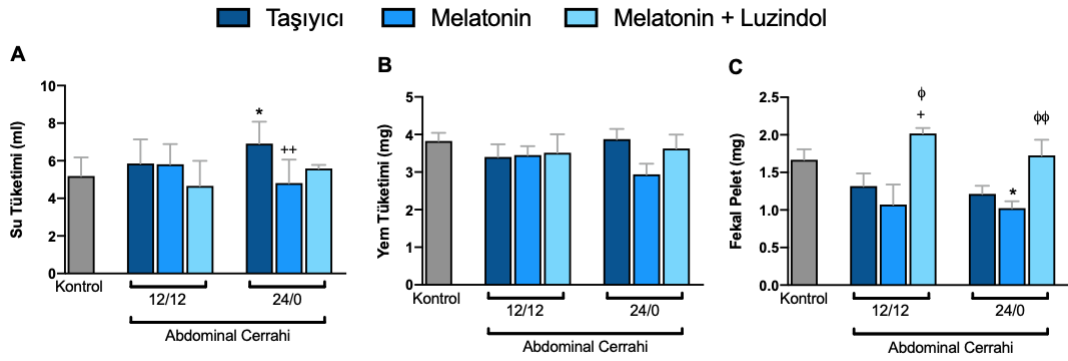
5.BULGULAR

4.7. Ağırlık Takibi, Su/Yem Tüketimi ve Kolon Motilite Ölçümü

Deney protokolü süresinde deneyler grupları arasında ağırlık değişimi açısından anlamlı fark saptanmadı.

Yem tüketimi açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. “24/0 cerrahi” grubunda taşıyıcı verilen sıçanların su tüketiminde kontrol grubuna göre anlamlı miktarda artış olduğu görüldü ($p<0.05$). Aynı grupta melatonin verilmesinin taşıyıcı gruba göre su tüketimini anlamlı düzeyde azalttığı görüldü ($p<0.01$). “12/12 ve 24/0 cerrahi” grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında su tüketimi açısından anlamlı fark saptanmadı.

“12/12 ve 24/0 cerrahi” gruplarında melatonin+luzindol verilen sıçanların melatonin verilen sıçanlara göre daha fazla fekal pelet çıkardığı görüldü ($p<0.01$ ve $p<0.01$). Ayrıca “24/0 cerrahi” grubunda melatonin verilen sıçanların kontrol grubuna göre daha az fekal pelet çıkardığı görüldü ($p<0.05$). “12/12 ve 24/0 cerrahi” grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında kolon motilitesi açısından anlamlı fark saptanmadı.



Şekil 5. Su/yem tüketimi ve kolon motilitesinin karşılaştırılması

A: Su tüketimi, B: Yem tüketimi, C: Fekal pelet ağırlığı

12/12: 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortam 24/0: 24 saat aydınlık ortam

* $p<0.05$ kontrol grubuna göre, + $p<0.05$, ++ $p<0.01$ taşıyıcı grubuna göre ve $\phi p<0.05$ $\phi\phi p<0.01$ melatonin grubuna göre.

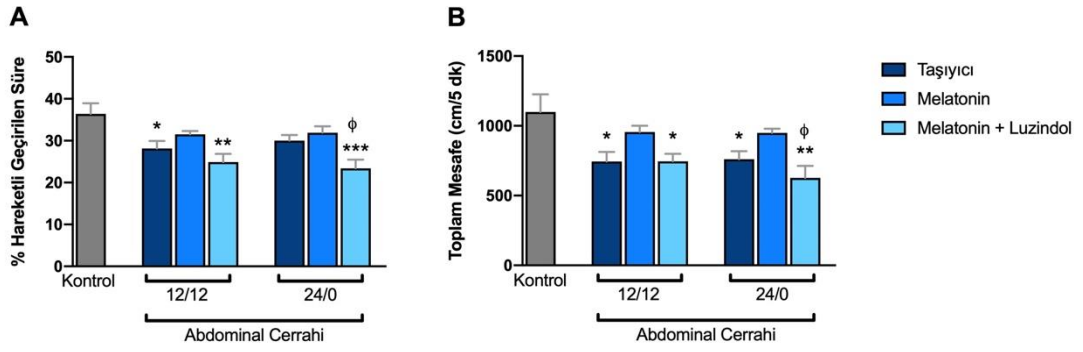
4.8. Davranış Deneyleri

4.8.1. Lokomotor aktivite

Lokomotor aktivitenin değerlendirilmesinde “12/12 cerrahi” grubunda taşıyıcı verilen sıçanların hareketli geçirdiği sürenin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha az olduğu ($p<0.05$), melatonin verilen sıçanlarda ise bu farkın ortadan kalktığı gözlemlendi. Melatonin reseptörlerinin bloke edildiği melatonin+luzindol verilen sıçanlarda yine kontrol grubuna göre hareketli geçirilen sürenin anlamlı olarak azaldığı izlendi ($p<0.01$). “24/0 cerrahi” grubunda ise taşıyıcı veya melatonin verilen sıçanlarda hareketli geçirilen süre kontrol grubuna göre fark saptanmazken melatonin+luzindol verilen grupta anlamlı olarak daha azdı ($p<0.001$). Ayrıca melatonin+luzindol verilen sıçanların melatonin verilenlere göre daha az hareketli olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

Sıçanların toplam vertikal ve horizontal düzlemde toplam kat ettiği mesafe değerlendirildiğinde “12/12 cerrahi” grubunda melatonin verilen sıçanlar ile kontrol grubu arasında fark saptanmazken taşıyıcı veya melatonin+luzindol verilen sıçanların kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha az mesafe kat ettiği gözlemlendi ($p<0.05$ ve $p<0.05$). “24/0 cerrahi” grubunda benzer şekilde taşıyıcı veya melatonin+luzindol verilen sıçanların kontrol grubuna göre daha az mesafe kat ettiği izlendi ($p<0.05$ ve $p<0.01$). Yine bu grupta da melatonin verilen sıçanlarla kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı. Ayrıca melatonin+luzindol verilen sıçanların melatonin verilenlere göre hareketli geçirilen süreye benzer şekilde daha az mesafe kat ettikleri gözlemlendi ($p<0.05$).

“12/12 ve 24/0 cerrahi” grupları kendi içinde karşılaştırıldığında hareketli geçirilen süre ve toplam kat edilen mesafe açısından anlamlı fark saptanmadı.



Şekil 6. Lokomotor aktivite parametrelerinin karşılaştırılması

A: Hareketi geçirilen süre (%), **B:** Toplam kat edilen mesafe

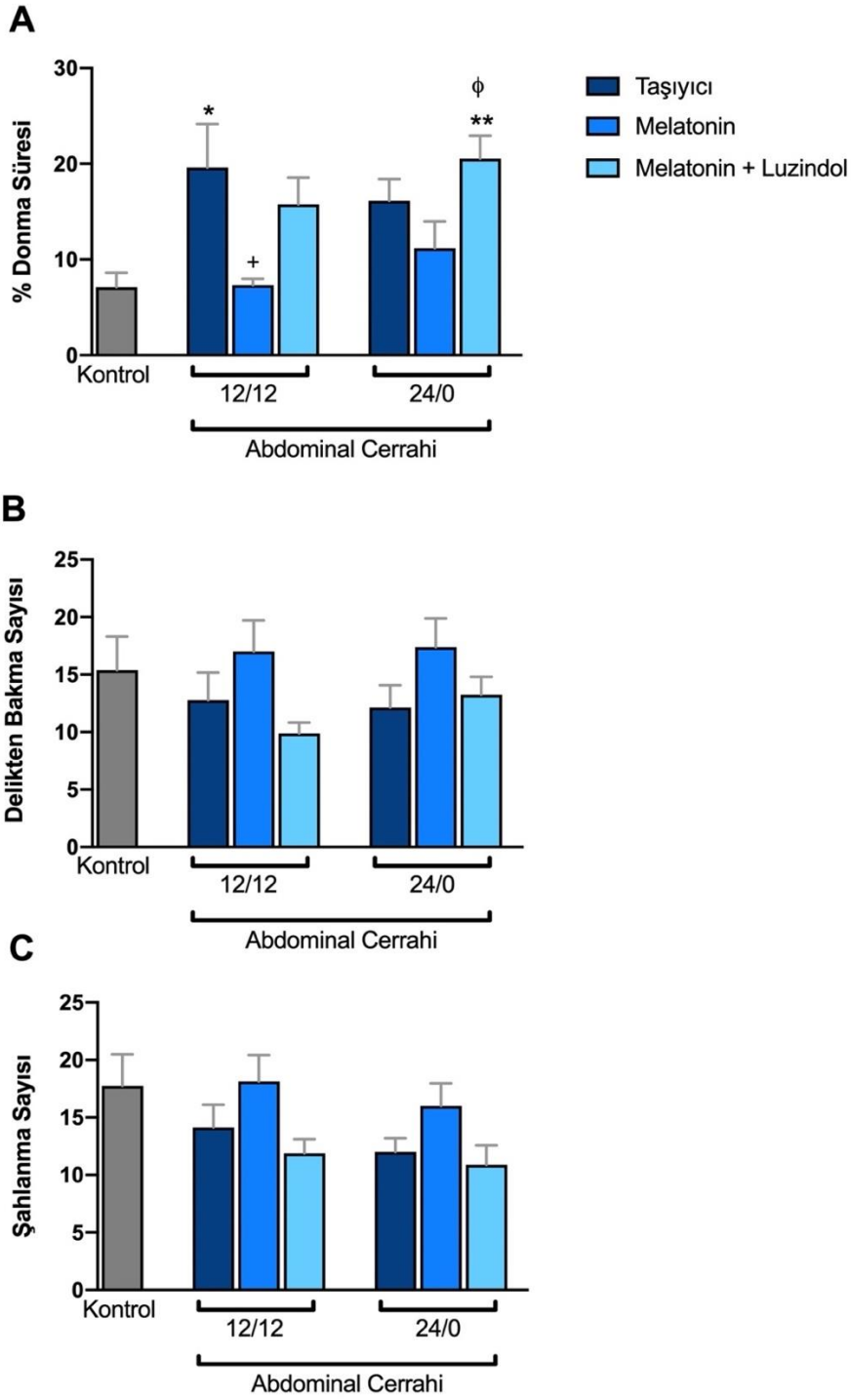
12/12: 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortam **24/0:** 24 saat aydınlık ortam

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ kontrol grubuna göre ve ^φ $p < 0.05$ melatonin grubuna göre.

4.8.2. Delikli levha testi

Sıçanların anksiyete seviyelerini değerlendirmek için yapılan delikli levha testinde “12/12 cerrahi” grubunda taşıyıcı verilen sıçanların kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla donma periyodu yaşadığı izlendi ($p < 0.05$). Grup içerisinde melatonin verilen sıçanlarda bu olumsuz etkinin anlamlı şekilde azaldığı saptandı ($p < 0.05$). “24/0 cerrahi” grubunda ise “12/12 cerrahi” grubuyla benzer şekilde taşıyıcı verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre daha fazla donma periyodu yaşadığı izlendiği ve melatonin verilen sıçanlarda bu olumsuz etkinin azaldığı gözlemlendi ancak istatistiksel anlam saptanmadı. “24/0 cerrahi” grubunda melatonin+luzindol verilen sıçanlarda hem kontrol grubuna göre ($p < 0.01$) hem de melatonin verilen sıçanlara göre ($p < 0.05$) anlamlı düzeyde daha fazla donma periyodu izlendi. “12/12 cerrahi” ve “24/0 cerrahi” grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı.

Grupların delikten bakma ve şahlanma sayıları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Ancak hem “12/12 cerrahi” grubunda hem de “24/0 cerrahi” grubunda melatonin verilen sıçanların daha fazla şahlanma ve delikten bakma eğilimleri gösterdiği gözlemlendi.



Şekil 7. Delikli levha testi sonuçlarının karşılaştırılması

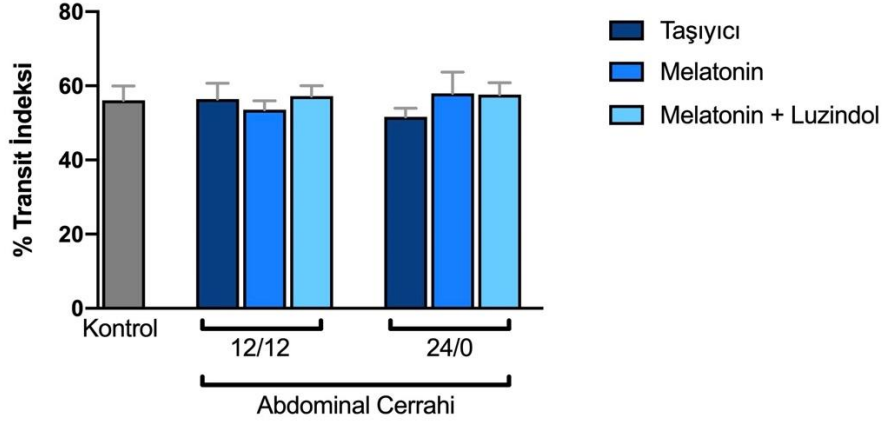
A: Donma süresi, **B:** Delikten bakma sayısı, **C:** Şahlanma sayısı.

12/12: 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortam **24/0:** 24 saat aydınlık ortam

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ kontrol grubuna göre, + $p < 0.05$ taşıyıcı grubuna göre ve $\phi p < 0.05$ melatonin grubuna göre.

4.9. İnce Bağırsak Motilitesinin Değerlendirilmesi

Dekapitasyon anında değerlendirilen ince bağırsak motilitesinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

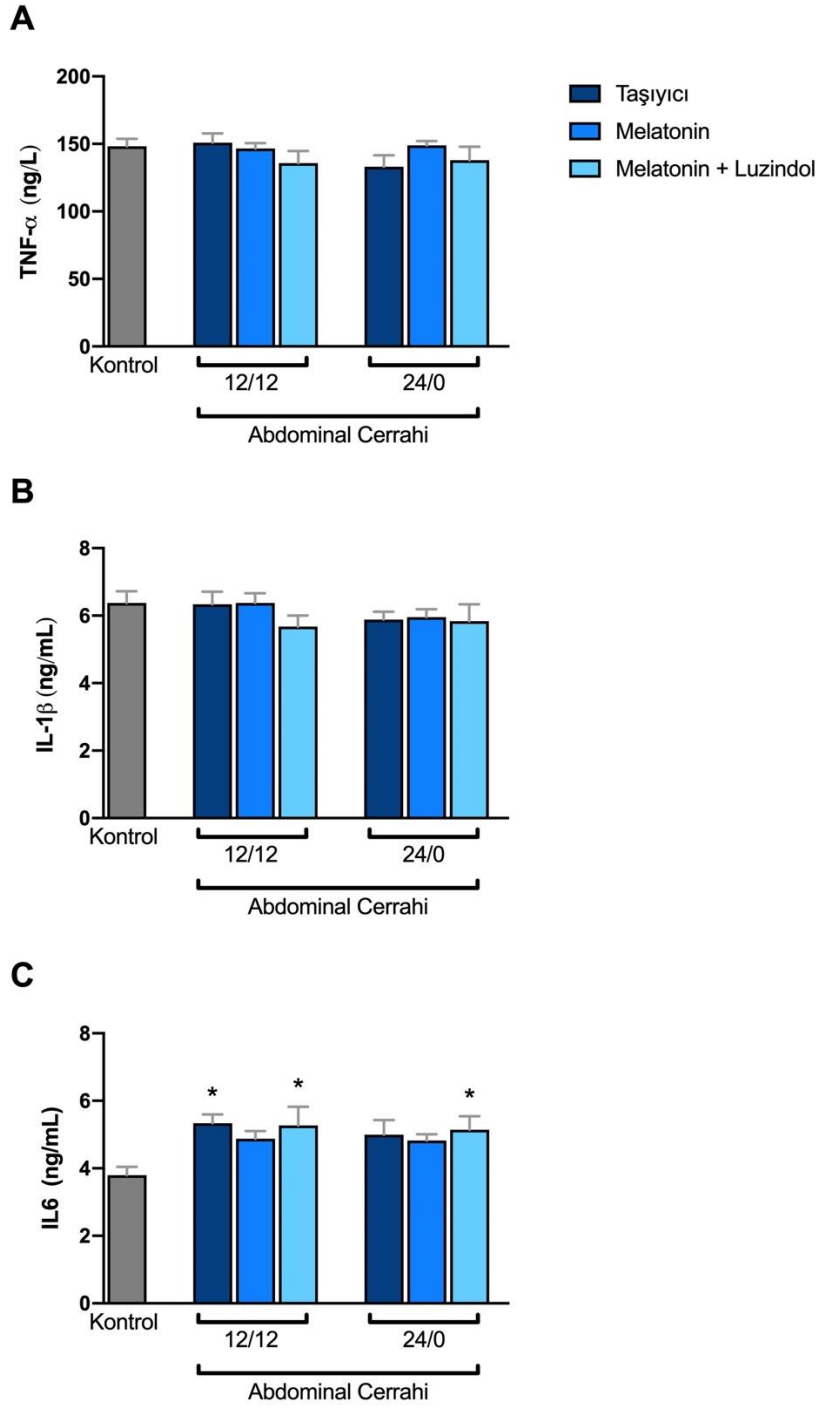


Şekil 8. İnce bağırsak transit indeksinin karşılaştırılması

12/12: 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortam 24/0: 24 saat aydınlık ortam

4.10. Serum sitokin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) Düzeyleri

Sistemik inflamasyonun göstergesi olarak serumda ölçülen TNF- α ve IL-1 β düzeylerinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Bununla birlikte “12/12 cerrahi” grubunda taşıyıcı veya melatonin+luzindol verilen sıçanların IL-6 düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü, melatonin verilen sıçanlarda ise bu yükseklik gözlenmedi. “24/0 cerrahi” grubunda ise melatonin+luzindol verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı IL-6 yüksekliği saptandı.



Şekil 9. Serum sitokin düzeylerinin karşılaştırılması

A: TNF- α düzeyi, **B:** IL-1 β düzeyi, **C:** IL-6 düzeyi

12/12: 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortam **24/0:** 24 saat aydınlık ortam

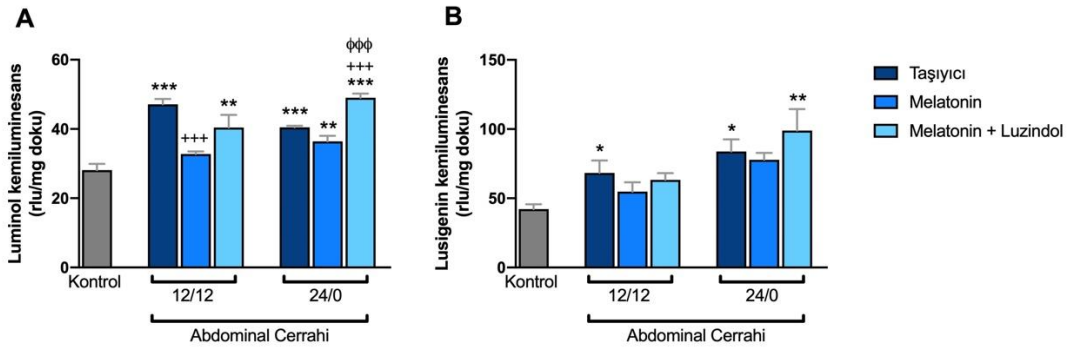
*p<0.05 kontrol grubuna göre

4.11. Kemiluminesans Yöntemi ile Ölçülen Reaktif Oksijen Türleri

İnce bağırsak dokusunda kemiluminesans luminol aracılı ölçüm ile hidroksil, hidrojen peroksit, hipoklorit ve hidroperoksil radikal düzeyleri ve lusigenin aracılı ölçüm ile süperoksit radikali düzeyi ölçüldü.

Luminol ölçümlerinde “12/12 cerrahi” grubunda taşıyıcı veya melatonin+luzindol verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek oksijen radikali saptandı ($p<0.01$ ve $p<0.001$). Aynı grup içerisinde melatonin verilen sıçanlarla kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı ve melatonin verilen sıçanlarda taşıyıcı verilene göre anlamlı düzeyde daha az oksijen radikali saptandı ($p<0.001$). “24/0 cerrahi” grubundaki tüm tedavi alt gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek oksijen radikali saptandı ($p<0.001$, $p<0.01$ ve $p<0.001$). Aynı zamanda melatonin+luzindol verilen sıçanlarda taşıyıcı veya melatonin verilene kıyasla anlamlı derecede daha fazla oksijen radikali saptandı ($p<0.001$ ve $p<0.001$).

Lusigenin ölçümlerinde “12/12 cerrahi” grubunda taşıyıcı verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek oksijen radikali saptandı ($p<0.05$). “24/0 cerrahi” grubundaki taşıyıcı veya melatonin+luzindol verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek oksijen radikali saptandı ($p<0.05$, $p<0.01$).



Şekil 10. Reaktif oksijen türlerinin karşılaştırılması

A: Luminol kemiluminesans ölçümleri, **B:** Lusigenin kemiluminesans ölçümleri

12/12: 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortam **24/0:** 24 saat aydınlık ortam

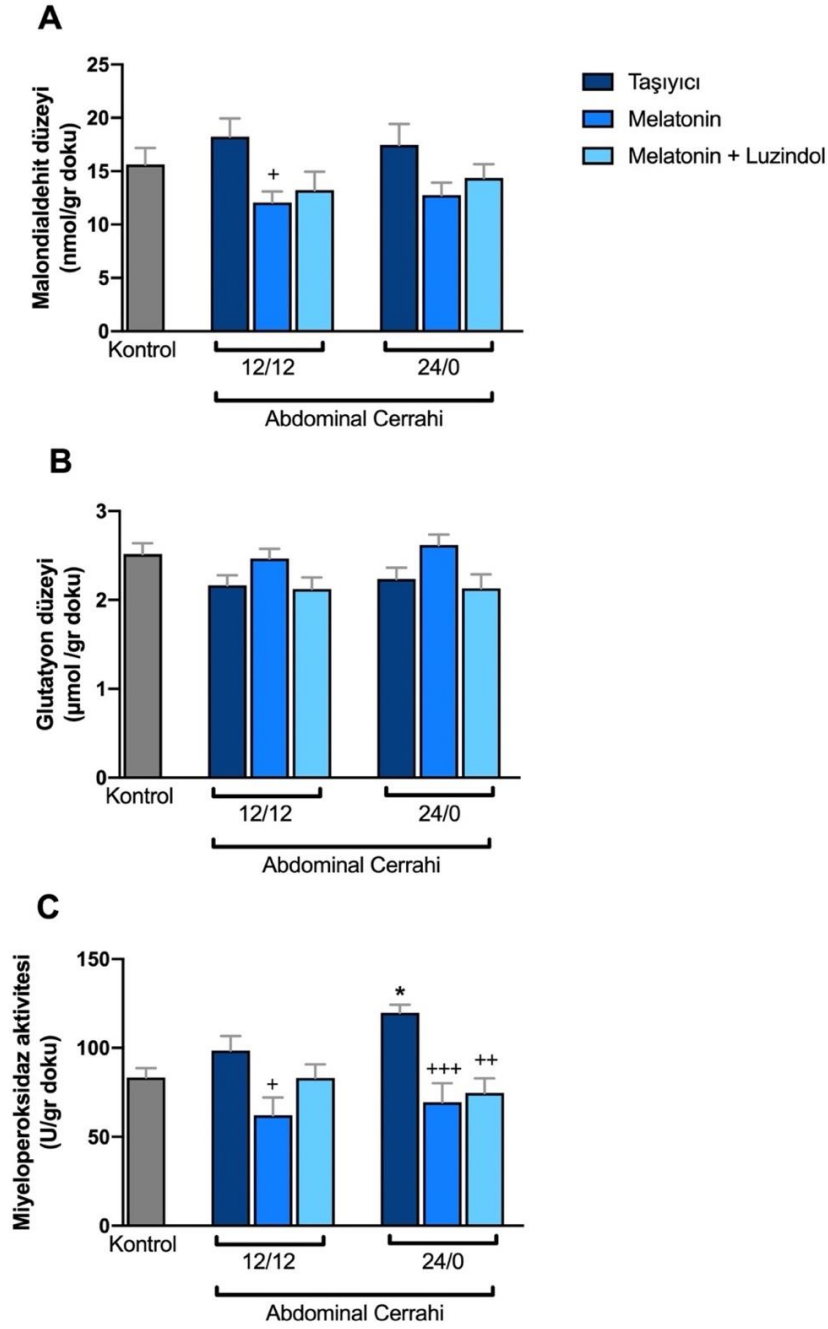
* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ kontrol grubuna göre, +++ $p<0.001$ taşıyıcı grubuna göre, $\phi\phi\phi$ $p<0.001$ melatonin grubuna göre.

4.12. Glutasyon, Malondialdehit Düzeyleri ve Miyeloperoksidaz Aktivitesi

Lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak ince bağırsak dokusunda malondialdehit düzeylerinin ölçümünde “12/12 cerrahi” grubundaki sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanmadı. Ancak grup içerisinde melatonin verilen sıçanların malondialdehit düzeyleri taşıyıcı grubuna göre anlamlı derecede daha düşük ölçüldü ($p<0.05$). “24/0 cerrahi” grubunda benzer şekilde kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanmadı. “24/0 cerrahi” grubu içerisinde melatonin veya melatonin+luzindol verilen sıçanlarda taşıyıcı verilenlere kıyasla daha düşük malondialdehit düzeyleri gözlemlense de istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

Grupların bağırsak dokusunda ölçülen glutasyon düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı.

“12/12 cerrahi” grubunda miyeloperoksidaz aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı. Ancak grup içerisinde melatonin verilen sıçanlarda taşıyıcı verilenlere göre anlamlı düzeyde düşük ölçüldü ($p<0.05$). “24/0 cerrahi” grubunda taşıyıcı verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek miyeloperoksidaz aktivitesi saptandı ($p<0.5$). “24/0 cerrahi” grubu içerisinde melatonin veya melatonin+luzindol teda taşıyıcı verilenlere kıyasla anlamlı derecede düşük miyeloperoksidaz aktivitesi saptandı ($p<0.01$ ve $p<0.001$).



Şekil 11. Malondialdehit, glutasyon düzeyleri ve miyeloperoksidaz aktivitesinin karşılaştırılması

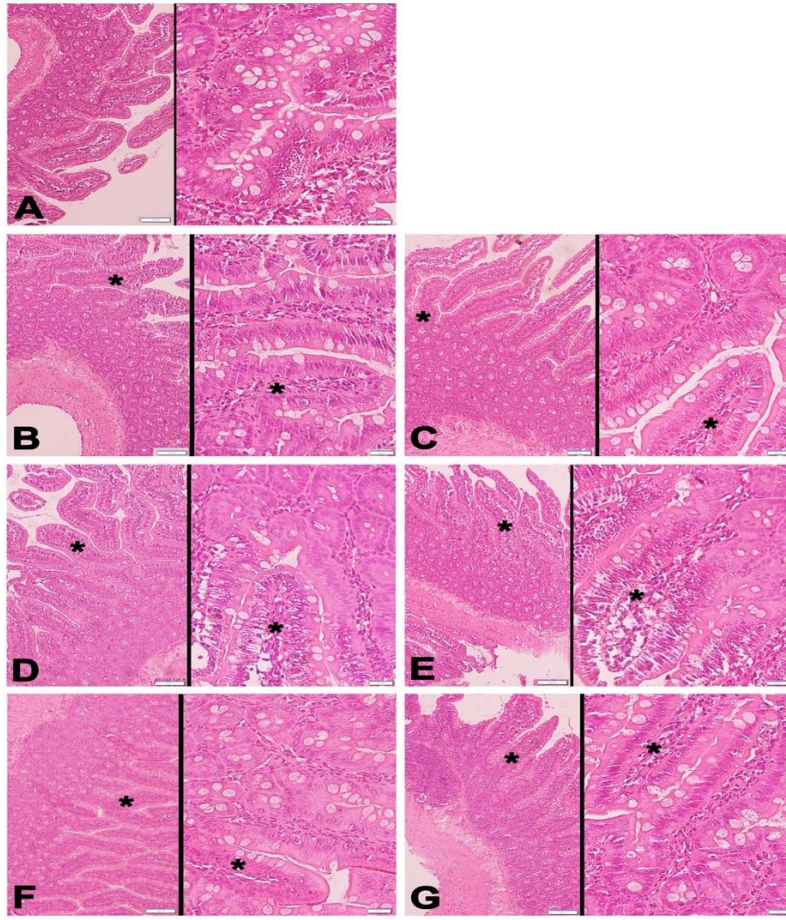
A: Malondialdehit düzeyi, **B:** Glutasyon düzeyi, **C:** Miyeloperoksidaz aktivitesi

12/12: 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortam, **24/0:** 24 saat aydınlık ortam

* $p < 0.05$ kontrol grubuna göre, ⁺ $p < 0.05$, ⁺⁺ $p < 0.01$, ⁺⁺⁺ $p < 0.001$ taşıyıcı grubuna göre

4.13. Histolojik Bulgular ve Skorlama

Kontrol grubunda düzenli morfolojide epitel ve goblet hücreleri ile çevrili villus yapıları ve Lieberkühn kriptalarını içeren mukoza tabakası, submukoza ve kas tabakaları gözlemlendi. “12/12 cerrahi” ve “24/0 cerrahi” gruplarındaki tüm sıçanlarda kontrol grubuna benzer şekilde düzenli morfolojide villus yapıları, Lieberkühn kriptaları olan mukoza tabakası, submukoza ve kas tabakaları gözlemlendi. Tüm gruplardaki incelenen her örnek düzenli morfolojide izlendi (skor=0)



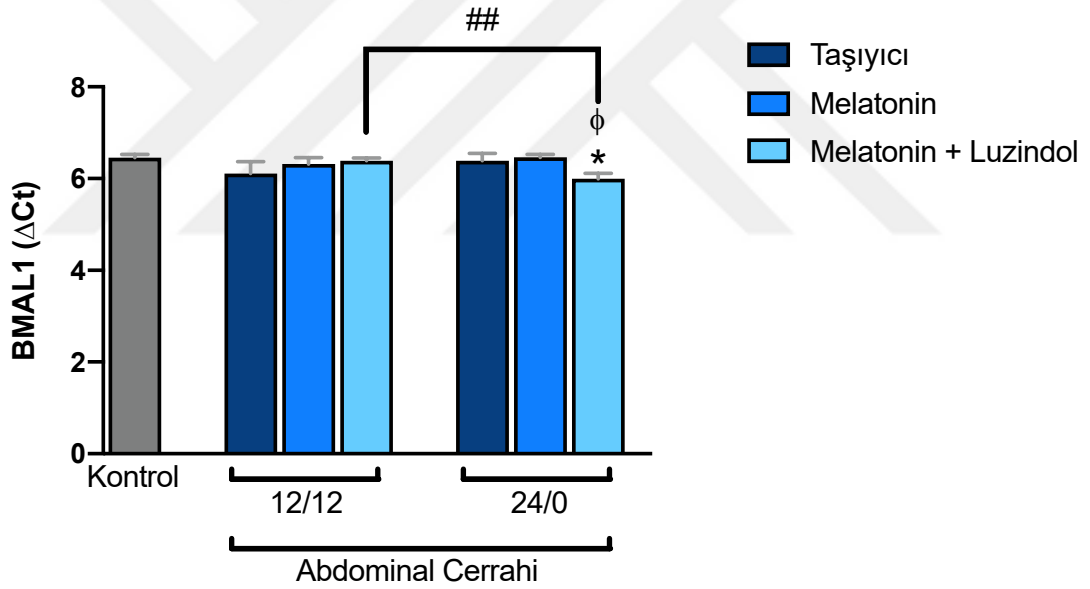
Şekil 12. Histolojik bulgular ve skorlama

Kontrol (A), 12/12+Taşıyıcı (B), 12/12+Melatonin (C), 12/12+Melatonin+Luzindol (D), 24/0+Taşıyıcı (E), 24/0+Melatonin (F) ve 24/0+Melatonin+Luzindol (G) gruplarında epitel ve goblet hücreleri ile çevrili villus yapıları (*) ve Lieberkühn kriptalarını içeren düzenli morfolojide mukoza tabakası, submukoza ve kas tabakaları görülmektedir. Hematoksilen&eoizin boyası, ölçek çubuğu: sol taraf: 100 µm, sağ taraf: 20 µm

4.14. BMAL1 Gen Ekspresyonu

“12/12 cerrahi” grubu ile kontrol grubunun BMAL1 gen ekspresyonları arasında fark saptanmadı.

“24/0 cerrahi” grubunda melatonin+luzindol tedavisi verilen sıçanlarda melatonin tedavisi verilen sıçanlara göre ($p<0.05$) ve kontrol grubuna göre ($p<0.05$) BMAL1 gen ekspresyonunun anlamlı derecede düşük olduğu görüldü. Ayrıca “12/12 cerrahi” ve “24/0 cerrahi” grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında melatonin+luzindol tedavisinin BMAL1 gen ekspresyonunu “24/0 cerrahi” grubunda anlamlı şekilde daha fazla azalttığı saptandı ($p<0.01$).



Şekil 13. BMAL1 gen ekspresyonunun karşılaştırılması

12/12: 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortam 24/0: 24 saat aydınlık ortam

* $p<0.05$ kontrol grubuna göre, $\phi p<0.05$ melatonin grubuna göre, ## $p<0.01$ melatonin+luzindol grupları arasında.

4.15. Bağırsak Mikrobiyota Sonuçları

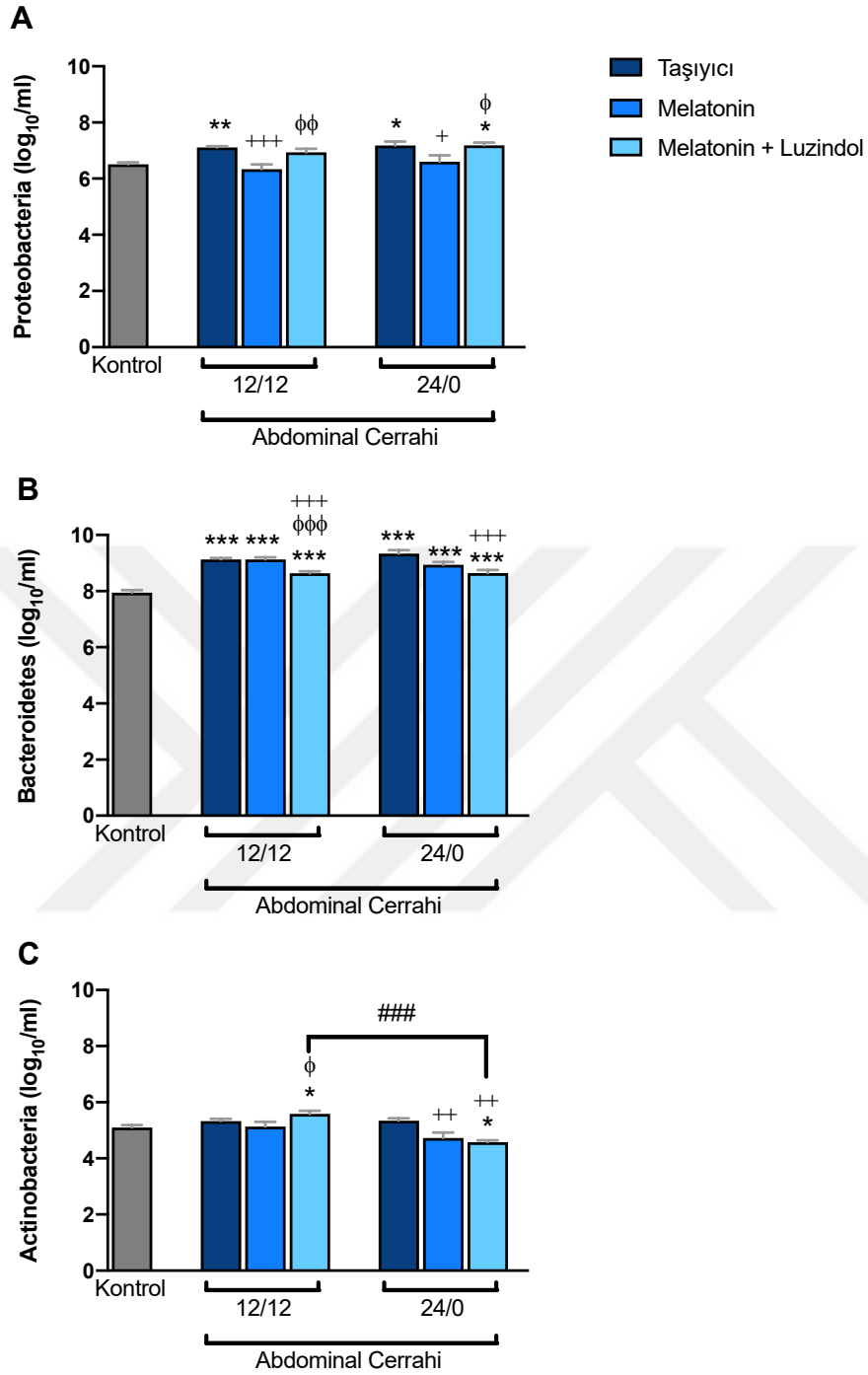
Bağırsak mikrobiyomundaki değişiklikleri değerlendirmek için feçes örneklerinde *Bacteroides*, *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* filumları belirlendi. Tüm gruplarda hakim bakteri filumunun *Bacteroides* olduğu görüldü.

Proteobacteria filumu, “12/12 cerrahi” ve “24/0 cerrahi” taşıyıcı gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı ($p<0.01$ ve $p<0.05$). Her iki cerrahi grubunda da melatonin tedavisinin *Proteobacteria* filumu kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşürdüğü görüldü ($p<0.001$ ve $p<0.05$). Ayrıca melatonin+luzindol tedavisi ile melatonin reseptörleri bloke edildiğinde *Proteobacteria* filumunun melatonin grubuna göre anlamlı şekilde arttığı tespit edildi ($p<0.01$ ve $p<0.05$).

Bacteroidetes filumu bütün cerrahi gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0.001$). “12/12 cerrahi” grubu içerisinde melatonin+luzindol tedavisi verilen sıçanlarda *Bacteroidetes* filumu taşıyıcı ve melatonin verilen sıçanlara göre anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0.001$ ve $p<0.001$). Benzer şekilde “24 cerrahi” grubunda melatonin+luzindol tedavisi *Bacteroidetes* filumunu taşıyıcı verilen sıçanlara göre anlamlı şekilde düşürdü.

“12/12 cerrahi” grubunda melatonin+luzindol tedavisinin *Actinobacteria* filumunu kontrol grubuna ve melatonin tedavisi verilen sıçanlara göre anlamlı düzeyde yükselttiği görüldü ($p<0.05$ ve $p<0.05$). “24 cerrahi” grubunda melatonin veya melatonin+luzindol tedavisi verilen sıçanlarda *Actinobacteria* filumu taşıyıcı verilen sıçanlara göre anlamlı şekilde düşük saptandı.

“12/12 cerrahi” ve “24/0 cerrahi” grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında *Proteobacteria* ve *Bacteroidetes* filumları açısından anlamlı fark saptanmadı. Ancak *Actinobacteria* filumu, “24 cerrahi” grubundaki melatonin+luzindol verilen sıçanlarda “12/12 cerrahi” grubundakilere göre anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0.001$).



Şekil 14. Kolonik mikrobiyotanın değerlendirilmesi

A: *Proteobacteria*, **B:** *Bacteroidetes*, **C:** *Actinobacteria*

12/12: 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortam **24/0:** 24 saat aydınlık ortam

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ kontrol grubuna göre, + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ taşıyıcı grubuna göre, ϕ $p < 0.05$, $\phi\phi$ $p < 0.01$, $\phi\phi\phi$ $p < 0.001$ melatonin grubuna göre, ### $p < 0.001$ melatonin+luzindol grupları arasında.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda abdominal intestinal iskemi/reperfüzyon modeli oluşturulan sıçanlarda aydınlık/karanlık döngüsünün ve melatonin reseptörlerinin postoperatif iyileşme dönemindeki rolü araştırılmıştır. Sıçanlarda postoperatif iyileşme sürecinin major cerrahi geçilen hastalarla benzer şekilde ilerlediğini gösterilmiştir. Deneş süresinde 5 günlük sürekli ışık maruziyetinin iyileşme periyodunda, davranışsal ve inflamatuvar parametreler açısından anlamlı değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır. Postoperatif dönemde aydınlık-karanlık döngüsünden bağımsız olarak melatoninin eksojen uygulanmasının anksiyeteyi azalttığı, lokomotor aktiviteyi arttırdığı ve reseptöre bağı bir mekanizma ile ROS oluşumunu ve inflamatuvar yanıtı azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, melatonin ve melatonin reseptörlerinin postoperatif dönemde bağırsak mikrobiyotasında meydana gelen olası disbiyozisi düzenleyici etkileri tartışılmıştır.

Melatoninin GİS'te düz kaslarda gevşetici etkiler gösterdiği ve peristaltizmi azalttığı bilinmektedir¹⁸. Bu gevşetici etki mukozal kanlanmayı arttırarak iskemi ve ülserle karşı koruma sağlamaktadır¹⁸⁹. İnsanlarla yapılan bir çalışmada melatonin verilmesinin kolon transit zamanını uzattığı gösterilmiştir¹⁸³. Çalışmamızda melatonin reseptörü bloke edilen sıçanlarda gözlenen artmış belirgin fekal pelet çıkışı, literatürle uyumlu olarak melatoninin reseptör bağımlı olarak kolon motilitesini azalttığını desteklemektedir. Ayrıca sürekli ışık altında taşıyıcı verilen sıçanların kontrol grubuna göre daha fazla su tüketmesi ve melatonin tedavisinin bu artmış su tüketimini kontrol seviyelerine düşürmesi, melatoninin GİS'te su ve elektrolit emilimini arttırdığını destekler niteliktedir¹⁴¹. Melatoninin su ve elektrolit emilimini arttırıcı etkileri fekal içeriğin derişimini arttırarak motilite üzerindeki yavaşlatıcı etkilerine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir²⁶².

Abdominal cerrahi gruplarında taşıyıcı verilen sıçanların lokomotor aktivite testinde toplam hareketli geçirilen sürelerinin ve toplam kat edilen mesafelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu gözlem sıçanlarda insanlara benzer şekilde postoperatif dönemde lokomotor aktivitenin azaldığını göstermektedir³. Melatoninin lokomotor aktivite üzerine etkileri prelinik çalışmalarla kapsamlı olarak incelenmiştir. Kemirgenler ve memeliler üzerinde yapılan araştırmalarla melatoninin lokomotor aktiviteyi azalttığını ve uykuya geçişini kolaylaştırdığı bildirilmiştir²⁶³. Tilden ve arkadaşları balıklar üzerinde yaptığı

araştırmada eksojen melatonin uygulamasının günün saatine bağlı olarak lokomotor aktivite üzerine farklı etkiler gösterdiğini gstermiřtir²⁶⁴. Yaşlanma, spinal kord hasarı ve nörodejeneratif hastalık modellerinde melatoninin egzersizle sinerjistik etki göstererek lokomotor aktiviteyi arttırdığı gsterilmiştir^{265,266}. Barbosa-Mndez S ve arkadaşlarının çalışmasında, melatoninin, kokain ile sensitize edilen sıçanlarda lokomotor aktiviteyi regüle ettiği gösterilmiş ve melatonin reseptörleri terapötik hedef olarak nerilmiřtir²⁶⁷. Çalışmamız, postoperatif dönemde sıçanlara uygulanan melatonin tedavisinin, cerrahi travmanın lokomotor aktivite üzerindeki azaltıcı etkilerini ışık siklusundan bağımsız olarak arttırabileceğini göstermiştir. Ayrıca melatonin reseptörlerinin bloke edilmesiyle birlikte lokomotor aktivite üzerindeki olumsuz etkinin daha da belirginleştiği grlmştir. Bu bulgu melatoninin lokomotor aktivite üzerindeki düzenleyici etkilerini reseptörleri üzerinden gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

Postoperatif dönemde anksiyete ve depresyon gibi duygu durum bozukluklarının görülebileceği ve bu durumların postoperatif iyileşmeyi ve hayat kalitesini olumsuz etkilediği bilinmektedir³. Kardiyak cerrahi geçiren hastalarda perioperatif yüksek anksiyete düzeyleri kötü postoperatif sonuçlarla iliřkilendirilmiřtir²⁶⁸. Çalışmamızda postoperatif anksiyete düzeyinin belirlemek için yapılan delikli levha testinde “12/12 cerrahi” taşıyıcı grubunda donma süresinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu ve melatonin tedavisinin bu yüksekliliği kontrol grubu seviyelerine indiği grlmştir. Ayrıca “24/0 cerrahi” grubunda melatonin reseptörü bloke edilen sıçanlarda hem kontrol hem de melatonin grubuna göre daha uzun süre donma periyodu izlenmiştir. İstatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da abdominal cerrahi gruplarında azalan delikten bakma ve şahlanma sayılarının melatonin tedavisiyle kontrol grubu ile benzer düzeye geldiği ve melatonin reseptörlerinin bloke edilmesinin bu olumlu etkiyi ortadan kaldırma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Melatoninin reseptör bağımlı anksiyolitik etkileri prelinik ve klinik araştırmalarla ortaya konmuştur^{176,269}. Güncel bir meta-analizde melatoninin perioperatif dönemde daha az yan etki profiliyle benzodiazepinlere benzer düzeyde anksiyolitik etki yaptığı gsterilmiřtir²⁷⁰. Çalışmamızdan elde edilen bulgular literatürle benzer şekilde melatoninin postoperatif dönemde reseptör bağımlı olarak anksiyolitik etki gösterdiğini desteklemektedir.

Major abdominal cerrahi sonrası stres tepkisiyle meydana gelen splanknik vazokonstriksiyon ve direkt olarak bağırsak dokusuna yapılan travmatik müdahaleler bağırsak dokusunda, özellikle de oldukça hassas villuslarda hipoksi ve iskemiye yol açmaktadır. Bu iskemi sonucu salınan DAMP'lar, sitokin yanıtı, inflamatuvar hücre göçü ve aktivasyonu, kompleman sisteminin aktivasyonu ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile karakterize kompleks bir inflamatuvar süreç başlatır²¹. Bu inflamatuvar yanıtın kontrollü şekilde çözülmesi ve reaktif oksijen türlerinin süpürülmesi postoperatif iyileşmenin temellerini oluşturmaktadır. Çalışmamızda ince bağırsak dokusunda lusigenin ve luminol problemleri ile ölçülen ROS düzeyleri hem "12/12 cerrahi" hem de "24/0 cerrahi" taşıyıcı gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bulgular, abdominal cerrahinin artan inflamatuvar yanıtla ve ROS üretimiyle ilişkili olduğunu gösteren önceki araştırmaları desteklemektedir³. Melatoninin reseptör bağımsız antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkileri bilinmektedir. Ayrıca membran reseptörleri aracılığıyla anti-oksidan ve pro-oksidan enzimlerin transkripsiyonunu düzenleyerek oksidan hasarını azalttığı gösterilmiştir¹². Çalışmamızda, "12/12 cerrahi" grubunda anlamlı olmak üzere melatonin tedavisi verilen sıçanlardaki ROS düzeylerinin taşıyıcı grubuna göre azalma eğilimi göstermesi melatoninin oksidan hasara karşı koruyucu olduğunu desteklemektedir. Tedaviye luzindol eklenerek melatonin reseptörleri bloke edildiğinde normal ışık siklusunda takip edilen sıçanların ROS düzeylerinde taşıyıcı grubuna göre azalma gözlenirken sürekli ışık altında takip edilen sıçanlarda artış saptanmıştır. Kemiluminesans ölçümlerinden elde edilen bu bulgular melatoninin anti-oksidan etki mekanizmasının normal ışık siklusunda reseptörden bağımsız, sürekli ışık altında reseptör bağımlı olacak şekilde ışık siklusuna göre değişiklik gösterebileceğini düşündürmektedir. Melatoninin farklı sistem ve dokulardaki anti-oksidan etkileri toksik madde maruziyeti, iskemi/reperfüzyon ve transplantasyon modellerinde kapsamlı şekilde araştırılmış ve kanıtlanmıştır¹². Özaçmak ve arkadaşları iskemi/reperfüzyon hasarı sonrasında melatonin tedavisinin sıçanların terminal ileumunda oksidan hasarın biyokimyasal ve morfolojik göstergelerini düzelttiğini göstermiştir²⁷¹. Çalışmamızdan elde edilen bulgular da melatoninin anti-oksidan potansiyelini ortaya koymaktadır.

Lipit peroksidasyonunun hücre membran geçirgenliğini arttırdığı ve hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir²⁷². Serbest radikal süpürücü etkisi nedeniyle melatonin lipit peroksidasyonunun önlenmesinde önemli bir molekül olarak görülmektedir²⁷³. Melatoninin lipit peroksidasyon ürünü olan MDA'yı azalttığı prelinik çalışmalarla kanıtlanmıştır^{273,274}. Çalışmamızda "12/12 cerrahi" grubunda MDA düzeyinin melatonin tedavisi verilmesiyle taşıyıcı grubuna göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Bununla birlikte hem "12/12 cerrahi" grubunda hem de "24/0 cerrahi" grubunda istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da melatonin veya melatonin+luzindol tedavisi verilen sıçanlarda taşıyıcı grubuna göre azalma eğilimi göstermiştir. Bu bulgular melatoninin ince bağırsak dokusunda lipit peroksidasyonunu reseptörden bağımsız olarak azalttığını desteklemektedir.

Bağışıklık yanıtının neredeyse her kolunun (doğal ve edinilmiş) sirkadiyen varyasyonlar varyasyonlar bilinmektedir. Doğal ve edinilmiş bağışıklık hücrelerinin üretim ve yıkımında, septik şoka yanıtta, sinyal tanıma reseptörlerinin ekspresyonunda, fagositozda, kompleman ve pıhtılaşma faktörlerinin üretiminde, sitokinlerin ve kemokinlerin üretiminde ritmik salınımlar meydana gelmektedir⁷³. Sirkadiyen ritmi bozulan farelerde LPS'ye bağlı sepsiste, inflamatuvar hücrelerde ve pro-inflamatuvar sitokin üretiminde artış olduğu gösterilmiştir⁷⁵. Çalışmamızda bağırsak dokusundaki lokal inflamasyonun göstergesi olarak ölçülen MPO aktivitesi 24/0 cerrahi taşıyıcı grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek ölçülürken 12/12 cerrahi taşıyıcı grubunda bu fark saptanmamıştır. Bu bulgu, bozulan ışık siklusunun bağırsak dokusundaki lokal inflamatuvar yanıtı şiddetlendirdiği şeklinde yorumlanabilir. Melatoninin iskemi/reperfüzyon ve sepsis araştırmalarında anti-inflamatuvar ve organ koruyucu etkileri ortaya konmuştur^{275,276}. Ayrıca kolit modellerinde lokal inflamasyonu ve hastalık şiddetini azalttığı bildirilmiştir²⁷⁷. Çalışmamızda MPO aktivitesinin hem "12/12 cerrahi" grubunda hem de "24/0 cerrahi" grubunda melatonin tedavisiyle birlikte taşıyıcı verilen sıçanlara göre anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür. Bu bulgu literatürle uyumlu olarak melatoninin gastrointestinal sistemde anti-inflamatuvar etkileri olduğunu göstermektedir. Ayrıca "24/0 cerrahi" grubunda melatonin+luzindol tedavisinin benzer şekilde MPO aktivitesini azaltması melatoninin anti-inflamatuvar etkisini reseptör bağımsız şekilde yaptığını düşündürmektedir.

Melatonin hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar özellikler sergileyebilen çift yönlü bir moleküldür. Ancak hayatı tehdit eden şiddetli inflamasyon durumunda anti-inflamatuar etki göstermektedir²⁷⁸. Bakteriyel lipopolisakksaritler kullanılarak yapılan sepsis modellerinde melatoninin anti-inflamatuar etki gösterdiği ve TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin düzeylerini azalttığı gösterilmiştir²¹⁵⁻²¹⁷. Çalışmamızda serum IL-6 düzeyi “12/12 cerrahi” grubunda taşıyıcı veya melatonin+luzindol tedavisi verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre daha yüksek saptanmıştır. Benzer şekilde sürekli ışık altında takip edilen ve melatonin+luzindol verilen sıçanlarda benzer şekilde kontrol grubuna göre anlamlı IL-6 yüksekliği gözlenmiştir. Her iki ışık protokolü altında melatonin tedavisi verilen sıçanların IL-6 düzeyleri ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Bu bulgular melatoninin reseptör bağımlı olarak pro-inflamatuar IL-6 salgısını azalttığını desteklemektedir. Bununla birlikte IL-6’dan farklı olarak TNF- α ve IL-1 β düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. Bu bulgu IL-6’nın yarı ömrünün daha uzun olması ve dolaşımında daha uzun süre yüksek konsantrasyonlarda saptanabilmesi ile açıklanabilir⁵⁸.

Çalışmamızda ince bağırsak dokularının histolojik incelemesinde tüm gruplarda düzenli morfolojide mukoza, submukoza ve kas tabakası izlenmiştir. Bulgularımız daha önce iskemi/reperfüzyon ve toksik ilaç ile oluşturulan modellerden farklı olarak melatoninin mikroskobik hasar üzerine koruyucu etkisini gösterememiştir^{271,279,280}. Melatoninin mikroskobik hasar üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmalarda travmatik etkiden sonraki ilk 24 saat içerisinde ya da kronik toksik ilaç maruziyeti sonunda doku örneklemeleri yapılmıştır. Çalışmamızda dokuların 96. saatte örneklenmesi cerrahi sonrası erken dönemde oluşabilecek iyileşme farklılıklarının değerlendirilememesine neden olmuş olabilir.

Sirkadiyen saat genlerinin ekspresyonu SKN başta olmak üzere hemen hemen tüm dokularda gösterilmiştir²⁸¹. BMAL1, PER, CLOCK gibi çeşitli sirkadiyen saat genleri GİS’te eksprese edilir ve sindirim, epitel yenilenmesi (hücre proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşması) ve emilim gibi bağırsak fonksiyonlarıyla ilişkilidir²⁸². Işık siklusunun ve reseptörleri aracılığıyla melatoninin SKN’de sirkadiyen saat genlerinin ekspresyonunun primer düzenleyicisi olduğu bilinmektedir^{281,283,284}. GİS’te bulunan saat genlerinin ekspresyonunun SKN’den gelen sinyallere bağımlı olarak ışık

siklusu ve beslenme ile düzenlendiği düşünülmektedir^{281,285}. Melatonin ile periferik saat genleri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar kısıtlıdır. Zaman ve arkadaşları melatoninin sıçan kalbinde PER ve BMAL1 ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir²⁸⁶. Ancak bildiğimiz kadarıyla GİS'te melatonin ve saat genlerinin ekspresyonu arasındaki ilişki araştırılmamıştır. Stokes ve arkadaşları radyasyon maruziyetini takiben intestinal rejenerasyon sırasında ritmik olarak eksprese olan sitokinlerin epitelde stres cevabı oluştuğunu, bu stres cevabını düzenleyen eden BMAL1'in intestinal epitelin proliferasyonunu düzenlediğini göstermiştir²⁷. Eum ve arkadaşları dört hafta sürekli ışığa maruz bırakılan farelerin bağırsak dokusunda BMAL1 ekspresyonunun ve bariyer fonksiyonlarının bozulduğu göstermişlerdir²⁸⁷. Çalışmamızda cerrahi taşıyıcı gruplarının intestinal BMAL1 ekspresyonu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Beş günlük ışık maruziyetinin intestinal BMAL1 ekspresyonunu etkilemediği ancak devamlı ışık altında melatonin reseptörlerinin bloke edilmesinin BMAL1 ekspresyonunu azalttığı görülmüştür. Bu bulgu GİS'te saat genlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde ışık siklusu ve melatonin reseptörlerin etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bağırsak mikrobiyotası, konakçıda besin maddelerinin metabolizması ve sentezi, peristaltizm, ilaç ve toksinlerin metabolize edilmesi ve bariyer fonksiyonları gibi birçok önemli işlevi gerçekleştirir²⁸⁸⁻²⁹⁰. İnsan mikrobiyotasını oluşturan bakterilerin büyük bölümü 4 ana şubeye ayrılır: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* ve *Proteobacteria*. *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* bu bakterilerin %90'ını temsil ederken *Actinobacteria* ve *Proteobacteria* kalan %10'luk kesimi oluşturmaktadır²⁹¹. Mikrobiyotanın dengesindeki bozulma otoimmün hastalıklar, endokrin hastalıklar, obezite, karsinogenez, nörolojik ve psikiyatrik birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir²⁹². Yakın zamanda yapılan bir derlemede bağırsak mikrobiyotasının gastrointestinal cerrahi sonrası komplikasyon gelişiminde etkili olduğu bildirilmiştir²⁹³. İntestinal iskemi/reperfüzyon sonrasında bağırsak mikrobiyotasında meydana gelen disbiyozis prelinik çalışmalarla kanıtlanmıştır²⁹⁴. Melatoninin, anti-oksidan, immünmodülatör ve sirkadiyen ritmi düzenleyici etkileri ile dolaylı olarak ve henüz aydınlatılmayan mekanizmalar ile doğrudan bağırsak mikrobiyotasını etkilediği düşünülmektedir²⁹⁵. Melatoninin, uyku yoksunluğu sonucu oluşan bariyer disfonksiyonu ve bağırsak mikrobiyotasındaki bozulmayı düzelttiği gösterilmiştir^{22,23}.

Proteobacteria filumunun hastalıkta arttığı gösterilmiş ve bazı yazarlar tarafından disbiyozin tanısız belirteci olarak tanımlanmıştır^{296,297}. Çalışmamızda taşıyıcı gruplarında *Proteobacteria* filumunun ışık siklusundan bağımsız olarak arttığı ve bu artışın melatonin tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir. Melatonin reseptörlerinin bloke edildiği gruplarda ise melatonin tedavisi verilen gruplara göre anlamlı bir artış izlenmiştir. Bu bulgular melatonin reseptör bağımlı bir mekanizma ile *Proteobacteria* filumunun artışını ve olası disbiyozisi düzelttiğini desteklemektedir. Çalışmamızda *Bacteroidetes* filumu literatürle uyumlu olarak iskemi/reperfüzyon sonrasında tüm gruplarda artış göstermiştir²⁹⁴. Bununla birlikte luzindol tedavisi ile melatonin reseptörleri bloke edildiğinde *Bacteroidetes* miktarının azaldığı görülmüştür. Melatonin *Bacteroidetes* filumunu koşullara bağılı olarak farklı şekilde etkilemektedir. Melatoninin yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde *Bacteroidetes* filumunu arttırırken, uyku yoksunluğu ile indüklenen intestinal bariyer disfonksiyonunda azalttığı gösterilmiştir^{22,23}. Bulgularımız, melatonin ve reseptörlerinin bağırsak mikrobiyotasında *Bacteroidetes* dağılımını etkilediğini göstermekle birlikte mekanizmanın açıklanması için ileri araştırmalara ihtiyaç vardır. Bağırsak mikrobiyotasının küçük bir bölümünü oluşturan *Actinobacteria*, bağırsak homeostazisinin geliştirilmesi ve korunmasında önemli rol oynaması nedeniyle potansiyel bir probiyotik olarak kabul edilmektedir²⁸⁹. *Actinobacteria* filumunun inflamatuvar bağırsak hastalığı ve nekrotizan enterokolit çalışmalarında iyileştirici etkileri bildirilmiştir²⁹⁸. Sirkadiyen ritim ve melatoninin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkileri yaygın olarak çalışılmış olsa da *Actinobacteria* filumu özelindeki veriler yetersiz kalmaktadır. Çalışmamızda, sürekli ışık altında melatonin reseptörlerinin bloke edilmesi *Actinobacteria* filumunu azaltmıştır. Beklenmedik şekilde, *Actinobacteria* filumu, sürekli ışık altında melatonin tedavisiyle azaltırken, normal ışık siklusunda melatonin reseptörlerinin bloke edilmesiyle artış göstermiştir. Tutarsız gibi görünen bu sonuçların ileri prelinik araştırmalar ile aydınlatılabileceğini düşünmekteyiz.

Postoperatif iyileşmeyi test eden bu deneysel modelin bazı sınırlamaları vardır. Öncelikle intestinal iskemi/reperfüzyon prensibiyle oluşturulan bu deney modelinde postoperatif iyileşme dönemindeki beslenme davranışları, duygudurum ve lokomotor aktivitenin yanında çoğunlukla GİS üzerindeki değişiklikler değerlendirilmiştir. Bu

nedenle bulgular abdominal cerrahi sonrası iyileşme periyodunda etkilenen akciğer ve böbrekler gibi diğer önemli organlara genellenmemektedir. Diş i sıçanlarda aydınlık/karanlık döngüsünden etkilenen östrus siklusu postoperatif iyileşme döneminde parametrelerin değerlendirilmesini güçleştirebileceğinden çalışmamızda sadece erkek sıçanlar kullanılmış ve iyileşmedeki cinsiyet farklılıkları modelimizde test edilmemiştir. Deney protokolü kapsamında serum ve doku örneklerinin dekapitasyon esnasında örneklenmesi postoperatif erken dönemdeki iyileşme açısından önemli değerlerin yorumlanmasını olumsuz etkileyebilir. İnce bağırsak dokusunda beklenen mikroskobik hasar bulgularının izlenmemesi, gruplar arasında benzer değerler gösteren sitokin düzeyleri, BMAL1 gen ekspresyonu ve intestinal transit zamanı bu handikaptan kaynaklanmış olabilir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak, intestinal iskemi/reperfüzyon prensibiyle oluşturulan abdominal cerrahi modelinde postoperatif dönemde aydınlık-karanlık döngüsünün ve melatonin reseptörlerinin rolü araştırılmıştır. Beş günlük sürekli ışık maruziyetinin postoperatif iyileşme döneminde anlamlı değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Bulgular, melatoninin postoperatif iyileşme sürecinde anksiyeteyi azaltıcı, lokomotor aktiviteyi arttırıcı, ROS seviyelerini ve inflamatuvar yanıtı azaltıcı ve kolon motilitesini düzenleyici etkilerinin olduğunu desteklemektedir. Beş günlük ışık maruziyetinin intestinal BMAL1 ekspresyonunu etkilemediği ancak devamlı ışık altında melatonin reseptörlerinin bloke edilmesinin BMAL1 ekspresyonunu azalttığı görülmüştür. Ayrıca, melatoninin ve melatonin reseptörlerinin postoperatif dönemde bağırsak mikrobiyotasında meydana gelen olası disbiyozisi düzenleyici etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Melatoninin etkilerinin, koşullara bağlı olarak reseptöre bağımlı veya reseptörden bağımsız olarak gerçekleştiği görülmüştür. Çalışmamız, melatoninin postoperatif dönemdeki potansiyel faydalarına ilişkin değerli bilgiler sağlarken, altta yatan mekanizmaları aydınlatmak ve sonuçları klinik ortamda doğrulamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKÇA

1. Rose J, Weiser TG, Hider P, Wilson L, Gruen RL, Bickler SW. Estimated need for surgery worldwide based on prevalence of diseases: a modelling strategy for the WHO Global Health Estimate. *Lancet Glob Health* 2015;3 Suppl 2(Suppl 2):S13-20. DOI: 10.1016/S2214-109X(15)70087-2.
2. Kleif J, Gogenur I. Severity classification of the quality of recovery-15 score- An observational study. *J Surg Res* 2018;225:101-107. DOI: 10.1016/j.jss.2017.12.040.
3. Cata JP, Patino M, Lacagnina MJ, et al. A rat model to investigate quality of recovery after abdominal surgery. *Pain Rep* 2021;6(2):e943. DOI: 10.1097/PR9.0000000000000943.
4. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 2000;127(2):117-26. DOI: 10.1067/msy.2000.101584.
5. Dantzer R. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009;29(2):247-64. DOI: 10.1016/j.iac.2009.02.002.
6. Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in Neurobiology* 2011;93(3):350-384. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.12.004>.
7. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res* 2003;34(1):75-8. DOI: 10.1034/j.1600-079x.2003.02111.x.
8. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, et al. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol* 2007;58(3):381-405. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928638>).
9. Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Digestive diseases and sciences* 2002;47:2336-2348.
10. Sener G, Toklu H, Kapucu C, et al. Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg Today* 2005;35(1):52-9. DOI: 10.1007/s00595-004-2879-1.
11. Sener G, Kacmaz A, User Y, Ozkan S, Tilki M, Yegen BC. Melatonin ameliorates oxidative organ damage induced by acute intra-abdominal compartment syndrome in rats. *J Pineal Res* 2003;35(3):163-8. DOI: 10.1034/j.1600-079x.2003.00070.x.
12. Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre - Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *Journal of pineal research* 2016;61(3):253-278.
13. Citera G, Arias MA, Maldonado-Cocco JA, et al. The effect of melatonin in patients with fibromyalgia: a pilot study. *Clin Rheumatol* 2000;19(1):9-13. DOI: 10.1007/s100670050003.
14. El-Shenawy SM, Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, El-Batran S, Arbid MS. Studies on the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of melatonin in the rat. *Pharmacol Res* 2002;46(3):235-43. DOI: 10.1016/s1043-6618(02)00094-4.

15. Yousaf F, Seet E, Venkatraghavan L, Abrishami A, Chung F, Warner DS. Efficacy and safety of melatonin as an anxiolytic and analgesic in the perioperative period: a qualitative systematic review of randomized trials. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 2010;113(4):968-976.
16. Chen CQ, Fichna J, Bashashati M, Li YY, Storr M. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J Gastroenterol* 2011;17(34):3888-98. (In eng). DOI: 10.3748/wjg.v17.i34.3888.
17. Drago F, Macaudo S, Salehi S. Small doses of melatonin increase intestinal motility in rats. *Digestive diseases and sciences* 2002;47:1969-1974.
18. Harlow HJ, Weekley BL. Effect of melatonin on the force of spontaneous contractions of in vitro rat small and large intestine. *Journal of pineal research* 1986;3(3):277-284.
19. Velarde E, Delgado M, Alonso - Gómez A. Serotonin - induced contraction in isolated intestine from a teleost fish (*Carassius auratus*): characterization and interactions with melatonin. *Neurogastroenterology & motility* 2010;22(12):e364-e373.
20. Grootjans J, Hodin CM, de Haan JJ, et al. Level of activation of the unfolded protein response correlates with Paneth cell apoptosis in human small intestine exposed to ischemia/reperfusion. *Gastroenterology* 2011;140(2):529-539.e3. (In eng). DOI: 10.1053/j.gastro.2010.10.040.
21. Patel JJ, Rosenthal MD, Miller KR, Martindale RG. The gut in trauma. *Current opinion in critical care* 2016;22(4):339-346.
22. Gao T, Wang Z, Dong Y, et al. Role of melatonin in sleep deprivation-induced intestinal barrier dysfunction in mice. *J Pineal Res* 2019;67(1):e12574. DOI: 10.1111/jpi.12574.
23. Xu P, Wang J, Hong F, et al. Melatonin prevents obesity through modulation of gut microbiota in mice. *Journal of pineal research* 2017;62(4):e12399.
24. Yildirim A, Arabaci Tamer S, Sahin D, et al. The effects of antibiotics and melatonin on hepato-intestinal inflammation and gut microbial dysbiosis induced by a short-term high-fat diet consumption in rats. *Br J Nutr* 2019;122(8):841-855. DOI: 10.1017/S0007114519001466.
25. Zhang Y, Markert MJ, Groves SC, Hardin PE, Merlin C. Vertebrate-like CRYPTOCHROME 2 from monarch regulates circadian transcription via independent repression of CLOCK and BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114(36):E7516-E7525. DOI: 10.1073/pnas.1702014114.
26. Young MW, Kay SA. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet* 2001;2(9):702-15. DOI: 10.1038/35088576.
27. Stokes K, Cooke A, Chang H, Weaver DR, Breault DT, Karpowicz P. The Circadian Clock Gene BMAL1 Coordinates Intestinal Regeneration. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2017;4(1):95-114. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2017.03.011.
28. Cavadini G, Petrzilka S, Kohler P, et al. TNF-alpha suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(31):12843-8. DOI: 10.1073/pnas.0701466104.
29. Bron R, Furness JB. Rhythm of digestion: keeping time in the gastrointestinal tract. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36(10):1041-8. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2009.05254.x.

30. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 2002;295(5557):1070-1073.
31. Potter GD, Skene DJ, Arendt J, Cade JE, Grant PJ, Hardie LJ. Circadian Rhythm and Sleep Disruption: Causes, Metabolic Consequences, and Countermeasures. *Endocr Rev* 2016;37(6):584-608. DOI: 10.1210/er.2016-1083.
32. Huang H, Jiang L, Shen L, et al. Impact of oral melatonin on critically ill adult patients with ICU sleep deprivation: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2014;15:327. DOI: 10.1186/1745-6215-15-327.
33. Boyko Y, Ørding H, Jennum P. Sleep disturbances in critically ill patients in ICU: how much do we know? *Acta anaesthesiologica scandinavica* 2012;56(8):950-958.
34. Hu RF, Jiang XY, Zeng YM, Chen XY, Zhang YH. Effects of earplugs and eye masks on nocturnal sleep, melatonin and cortisol in a simulated intensive care unit environment. *Crit Care* 2010;14(2):R66. DOI: 10.1186/cc8965.
35. Yasar NF, Badak B, Canik A, et al. Effects of Sleep Quality on Melatonin Levels and Inflammatory Response after Major Abdominal Surgery in an Intensive Care Unit. *Molecules* 2017;22(9). DOI: 10.3390/molecules22091537.
36. Lim GB. Circadian rhythms influence surgical outcomes. *Nature Reviews Cardiology* 2018;15(1):5-5.
37. Samanta S, Ali SA. Impact of circadian clock dysfunction on human health. *Exploration of Neuroscience* 2022;1(1):4-30. DOI: 10.37349/en.2022.00002.
38. Codoñer-Franch P, Gombert M. Circadian rhythms in the pathogenesis of gastrointestinal diseases. *World journal of gastroenterology* 2018;24(38):4297.
39. Weiser TG, Regenbogen SE, Thompson KD, et al. An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. *The Lancet* 2008;372(9633):139-144. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60878-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60878-8).
40. Carney MJ, Weissler JM, Fox JP, Tecce MG, Hsu JY, Fischer JP. Trends in open abdominal surgery in the United States-Observations from 9,950,759 discharges using the 2009-2013 National Inpatient Sample (NIS) datasets. *Am J Surg* 2017;214(2):287-292. (In eng). DOI: 10.1016/j.amjsurg.2017.01.001.
41. Ni Choileain N, Redmond HP. Cell Response to Surgery. *Archives of Surgery* 2006;141(11):1132-1140. DOI: 10.1001/archsurg.141.11.1132.
42. Pugin J. How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Ann Intensive Care* 2012;2(1):27. (In eng). DOI: 10.1186/2110-5820-2-27.
43. Alazawi W, Pirmadjid N, Lahiri R, Bhattacharya S. Inflammatory and Immune Responses to Surgery and Their Clinical Impact. *Annals of Surgery* 2016;264(1):73-80. DOI: 10.1097/sla.0000000000001691.
44. Huber-Lang M, Lambris JD, Ward PA. Innate immune responses to trauma. *Nature Immunology* 2018;19(4):327-341. DOI: 10.1038/s41590-018-0064-8.
45. Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical

- intensive care. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 2012;72(6):1491-1501.
46. Fung A, Vizcaychipi M, Lloyd D, Wan Y, Ma D. Central nervous system inflammation in disease related conditions: mechanistic prospects. *Brain research* 2012;1446:144-155.
 47. Walker JJ, Terry JR, Lightman SL. Origin of ultradian pulsatility in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2010;277(1688):1627-1633.
 48. Manou-Stathopoulou V, Korbonits M, Ackland GL. Redefining the perioperative stress response: a narrative review. *British journal of anaesthesia* 2019;123(5):570-583.
 49. Annane D, Pastores SM, Arlt W, et al. Critical illness-related corticosteroid insufficiency (CIRCI): a narrative review from a Multispecialty Task Force of the Society of Critical Care Medicine (SCCM) and the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Intensive care medicine* 2017;43:1781-1792.
 50. Corbett* SA. Systemic Response to Injury and Metabolic Support. In: Brunicki FC, Andersen DK, Billiar TR, et al., eds. *Schwartz's Principles of Surgery*, 10e. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2015.
 51. Takala J, Ruokonen E, Webster NR, et al. Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults. *New England Journal of Medicine* 1999;341(11):785-792.
 52. Cheyuo C, Jacob A, Wang P. Ghrelin-mediated sympathoinhibition and suppression of inflammation in sepsis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2012;302(3):E265-E272.
 53. van der Poll T, Coyle SM, Barbosa K, Braxton CC, Lowry SF. Epinephrine inhibits tumor necrosis factor- α and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J Clin Invest* 1996;97(3):713-9. DOI: 10.1172/JCI118469.
 54. Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang M, Sarma JV, Ward PA. Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? *Mol Med* 2008;14(3-4):195-204. DOI: 10.2119/2007-00105.Flierl.
 55. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunology today* 1994;15(2):74-80.
 56. Dekker A-BE, Krijnen P, Schipper IB. Predictive value of cytokines for developing complications after polytrauma. *World journal of critical care medicine* 2016;5(3):187.
 57. Ohzato H, Yoshizaki K, Nishimoto N, et al. Interleukin-6 as a new indicator of inflammatory status: detection of serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein after surgery. *Surgery* 1992;111(2):201-209.
 58. Jawa RS, Anillo S, Huntoon K, Baumann H, Kulaylat M. Interleukin-6 in surgery, trauma, and critical care part II: clinical implications. *Journal of intensive care medicine* 2011;26(2):73-87.
 59. Qiao Z, Wang W, Yin L, et al. Using IL-6 concentrations in the first 24 h following trauma to predict immunological complications and mortality in trauma patients: a meta-analysis. *European journal of trauma and emergency surgery* 2018;44:679-687.

60. Lord JM, Midwinter MJ, Chen Y-F, et al. The systemic immune response to trauma: an overview of pathophysiology and treatment. *The Lancet* 2014;384(9952):1455-1465.
61. DeLano FA, Hoyt DB, Schmid-Schönbein GW. Pancreatic digestive enzyme blockade in the intestine increases survival after experimental shock. *Science translational medicine* 2013;5(169):169ra11-169ra11.
62. Fishman JE, Sheth SU, Levy G, et al. Intraluminal nonbacterial intestinal components control gut and lung injury following trauma-hemorrhagic shock. *Annals of surgery* 2014;260(6):1112.
63. Charbonney E, Tsang JY, Li Y, et al. Endotoxemia following multiple trauma: risk factors and prognostic implications. *Critical care medicine* 2016;44(2):335-341.
64. Marshall JC, Christou NV, Meakins JL. The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure. *Annals of surgery* 1993;218(2):111.
65. Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol* 2010;72:551-77. (In eng). DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135919.
66. Schibler U, Gotic I, Saini C, et al. Clock-Talk: Interactions between Central and Peripheral Circadian Oscillators in Mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2015;80:223-32. (In eng). DOI: 10.1101/sqb.2015.80.027490.
67. Benna C, Helfrich-Förster C, Rajendran S, et al. Genetic variation of clock genes and cancer risk: a field synopsis and meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8(14):23978-23995. (In eng). DOI: 10.18632/oncotarget.15074.
68. Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews Genetics* 2017;18(3):164-179.
69. Yang Y, Xu T, Zhang Y, Qin X. Molecular basis for the regulation of the circadian clock kinases CK1 δ and CK1 ϵ . *Cell Signal* 2017;31:58-65. (In eng). DOI: 10.1016/j.cellsig.2016.12.010.
70. Busino L, Bassermann F, Maiolica A, et al. SCFFbx13 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins. *Science* 2007;316(5826):900-4. (In eng). DOI: 10.1126/science.1141194.
71. Gallego M, Virshup DM. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(2):139-48. (In eng). DOI: 10.1038/nrm2106.
72. Landgraf D, Wang LL, Diemer T, Welsh DK. NPAS2 Compensates for Loss of CLOCK in Peripheral Circadian Oscillators. *PLoS Genet* 2016;12(2):e1005882. (In eng). DOI: 10.1371/journal.pgen.1005882.
73. Man K, Loudon A, Chawla A. Immunity around the clock. *Science* 2016;354(6315):999-1003.
74. Curtis AM, Fagundes CT, Yang G, et al. Circadian control of innate immunity in macrophages by miR-155 targeting Bmal1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015;112(23):7231-7236.
75. Castanon-Cervantes O, Wu M, Ehlen JC, et al. Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption. *The Journal of Immunology* 2010;185(10):5796-5805.

76. Silver AC, Arjona A, Walker WE, Fikrig E. The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. *Immunity* 2012;36(2):251-261.
77. Spengler ML, Kuropatwinski KK, Comas M, et al. Core circadian protein CLOCK is a positive regulator of NF- κ B-mediated transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012;109(37):E2457-E2465.
78. Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu Y, Yun K, Cox JS, Chawla A. Circadian gene *Bmal1* regulates diurnal oscillations of Ly6Chi inflammatory monocytes. *Science* 2013;341(6153):1483-1488.
79. Gibbs JE, Blaikley J, Beesley S, et al. The nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012;109(2):582-587.
80. Martchenko A, Martchenko SE, Biancolin AD, Brubaker PL. Circadian Rhythms and the Gastrointestinal Tract: Relationship to Metabolism and Gut Hormones. *Endocrinology* 2020;161(12) (In eng). DOI: 10.1210/endocr/bqaa167.
81. Stephan FK, Swann JM, Sisk CL. Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behavioral and neural biology* 1979;25(4):545-554.
82. Hoogerwerf WA, Hellmich HL, Cornélissen G, et al. Clock gene expression in the murine gastrointestinal tract: endogenous rhythmicity and effects of a feeding regimen. *Gastroenterology* 2007;133(4):1250-1260.
83. Alvarez Y, Glotfelty LG, Blank N, Dohnalová L, Thaiss CA. The microbiome as a circadian coordinator of metabolism. *Endocrinology* 2020;161(6):bqaa059.
84. Choi H, Rao MC, Chang EB. Gut microbiota as a transducer of dietary cues to regulate host circadian rhythms and metabolism. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2021;18(10):679-689.
85. Lopez DEG, Lashinger LM, Weinstock GM, Bray MS. Circadian rhythms and the gut microbiome synchronize the host's metabolic response to diet. *Cell Metabolism* 2021;33(5):873-887.
86. Hoogerwerf WA, Shahinian VB, Cornélissen G, et al. Rhythmic changes in colonic motility are regulated by period genes. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2010;298(2):G143-G150.
87. Yamaguchi M, Kotani K, Tsuzaki K, et al. Circadian rhythm genes CLOCK and PER3 polymorphisms and morning gastric motility in humans. *PloS one* 2015;10(3):e0120009.
88. Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. Circadian rhythms: a regulator of gastrointestinal health and dysfunction. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;13(5):411-424. (In eng). DOI: 10.1080/17474124.2019.1595588.
89. Scheer FA, Morris CJ, Shea SA. The internal circadian clock increases hunger and appetite in the evening independent of food intake and other behaviors. *Obesity* 2013;21(3):421-423.
90. LeSauter J, Hoque N, Weintraub M, Pfaff DW, Silver R. Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;106(32):13582-13587.

91. Wang Q, Yin Y, Zhang W. Ghrelin restores the disruption of the circadian clock in steatotic liver. *International journal of molecular sciences* 2018;19(10):3134.
92. Summa KC, Voigt RM, Forsyth CB, et al. Disruption of the circadian clock in mice increases intestinal permeability and promotes alcohol-induced hepatic pathology and inflammation. *PloS one* 2013;8(6):e67102.
93. Pagel R, Bär F, Schröder T, et al. Circadian rhythm disruption impairs tissue homeostasis and exacerbates chronic inflammation in the intestine. *The FASEB Journal* 2017;31(11):4707.
94. Wang S, Lin Y, Yuan X, Li F, Guo L, Wu B. REV-ERB α integrates colon clock with experimental colitis through regulation of NF- κ B/NLRP3 axis. *Nature communications* 2018;9(1):4246.
95. Amara J, Saliba Y, Hajal J, et al. Circadian rhythm disruption aggravates DSS-induced colitis in mice with fecal calprotectin as a marker of colitis severity. *Digestive Diseases and Sciences* 2019;64:3122-3133.
96. Bellet MM, Deriu E, Liu JZ, et al. Circadian clock regulates the host response to Salmonella. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013;110(24):9897-9902.
97. Tsoumtsa LL, Torre C, Ghigo E. Circadian control of antibacterial immunity: findings from animal models. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2016;6:54.
98. Yoshida D, Aoki N, Tanaka M, Aoyama S, Shibata S. The circadian clock controls fluctuations of colonic cell proliferation during the light/dark cycle via feeding behavior in mice. *Chronobiology International* 2015;32(8):1145-1155.
99. Wang Y, Qian R, Sun N, Lu C, Chen Z, Hua L. Circadian gene hClock enhances proliferation and inhibits apoptosis of human colorectal carcinoma cells in vitro and in vivo. *Molecular Medicine Reports* 2015;11(6):4204-4210.
100. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature* 2007;449(7164):804-810.
101. Voigt RM, Forsyth CB, Green SJ, Engen PA, Keshavarzian A. Chapter Nine - Circadian Rhythm and the Gut Microbiome. In: Cryan JF, Clarke G, eds. *International Review of Neurobiology*: Academic Press; 2016:193-205.
102. Thaiss CA, Zeevi D, Levy M, et al. Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell* 2014;159(3):514-529.
103. Voigt RM, Forsyth CB, Green SJ, et al. Circadian disorganization alters intestinal microbiota. *PloS one* 2014;9(5):e97500.
104. Voigt RM, Summa KC, Forsyth CB, et al. The circadian clock mutation promotes intestinal dysbiosis. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2016;40(2):335-347.
105. Liang X, Bushman FD, FitzGerald GA. Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015;112(33):10479-10484.
106. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. ISOLATION OF MELATONIN, THE PINEAL GLAND FACTOR THAT LIGHTENS

- MELANOCYTES1. *Journal of the American Chemical Society* 1958;80(10):2587-2587. DOI: 10.1021/ja01543a060.
107. Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV. STRUCTURE OF MELATONIN1. *Journal of the American Chemical Society* 1959;81(22):6084-6085. DOI: 10.1021/ja01531a060.
 108. Hoffman RA, Reiter RJ. Influence of compensatory mechanisms and the pineal gland on dark-induced gonadal atrophy in male hamsters. *Nature* 1965;207(997):658-9. DOI: 10.1038/207658a0.
 109. Reiter RJ. Influence of pinealectomy on the breeding capability of hamsters maintained under natural photoperiodic and temperature conditions. *Neuroendocrinology* 1974;13(6):366-70. DOI: 10.1159/000122222.
 110. Tamarkin L, Baird CJ, Almeida OF. Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science* 1985;227(4688):714-20. DOI: 10.1126/science.3881822.
 111. Redman J, Armstrong S, Ng KT. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 1983;219(4588):1089-91. DOI: 10.1126/science.6823571.
 112. Armstrong SM, Cassone VM, Chesworth MJ, Redman JR, Short RV. Synchronization of mammalian circadian rhythms by melatonin. *J Neural Transm Suppl* 1986;21:375-94. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3462339>).
 113. Reiter RJ, Tan D-X, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Progress in brain research* 2010;181:127-151.
 114. Nakamura E, Kozaki K, Tsuda H, et al. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1 A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Sci* 2008;99(7):1390-400. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.00838.x.
 115. Yasmin F, Sutradhar S, Das P, Mukherjee S. Gut melatonin: A potent candidate in the diversified journey of melatonin research. *Gen Comp Endocrinol* 2021;303:113693. DOI: 10.1016/j.ygcen.2020.113693.
 116. Vaghari-Tabari M, Moein S, Alipourian A, et al. Melatonin and inflammatory bowel disease: From basic mechanisms to clinical application. *Biochimie* 2022. DOI: 10.1016/j.biochi.2022.12.007.
 117. Axelrod J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 1974;184(4144):1341-8. DOI: 10.1126/science.184.4144.1341.
 118. Zhao X, Stafford BK, Godin AL, King WM, Wong KY. Photoresponse diversity among the five types of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *The Journal of physiology* 2014;592(7):1619-1636.
 119. Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology (Bethesda)* 2014;29(5):325-33. (In eng). DOI: 10.1152/physiol.00011.2014.
 120. Reiter R, Hester R. Interrelationships of the pineal gland, the superior cervical ganglia and the photoperiod in the regulation of the endocrine systems of hamsters. *Endocrinology* 1966;79(6):1168-1170.
 121. Schomerus C, Korf HW. Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1057:372-83. DOI: 10.1196/annals.1356.028.

122. Schomerus C, Maronde E, Laedtke E, Korf H-W. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) induce phosphorylation of the transcription factor CREB in subpopulations of rat pinealocytes: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Cell and tissue research* 1996;286:305-313.
123. Raikhlin N, Kvetnoy I. Lightening effect of the extract of human appendix mucosa on frog skin melanophores. *Bull Exp Biol Med* 1974;8:114-116.
124. Raikhlin N, Kvetnoi I. Biological identification of melatonin in enterochromaffin cells. *Electronic Journal of Information Technology in Construction* 1974;215(1-6):132-133.
125. RAIKHLIN NT, KVETNOY IM, KADAGIDZE ZG, SOKOLOV AV. Immunomorphological studies on synthesis of melatonin in enterochromaffine cells. *Acta Histochemica et Cytochemica* 1978;11(1):75-77.
126. Bubenik G, Brown G, Grota L. Immunohistological localization of melatonin in the rat digestive system. *Experientia* 1977;33:662-663.
127. Hong G-X, Pang S. N-acetyltransferase activity in the quail (*Coturnix coturnix* jap) duodenum. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 1995;112(2):251-255.
128. Quay W, Ma Y. Demonstration of gastrointestinal hydroxyindole-O-methyltransferase. *IRCS Med Sci* 1976;4:563.
129. Bubenik GA, Brown GM. Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of rats. *Neurosignals* 1997;6(1):40-44.
130. Huether G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia* 1993;49:665-670.
131. Bubenik G, Pang S, Hacker R, Smith P. Melatonin concentrations in serum and tissues of porcine gastrointestinal tract and their relationship to the intake and passage of food. *Journal of pineal research* 1996;21(4):251-256.
132. Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life sciences* 1992;51(12):945-953.
133. Yaga K, Reiter RJ, Richardson BA. Tryptophan loading increases daytime serum melatonin levels in intact and pinealectomized rats. *Life sciences* 1993;52(14):1231-1238.
134. Tan D-x, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Hanes MA, Farley NJ. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life sciences* 1999;65(23):2523-2529.
135. Huether G, Messner M, Rodenbeck A, Hardeland R. Effect of continuous melatonin infusions on steady - state plasma melatonin levels in rats under near physiological conditions. *Journal of pineal research* 1998;24(3):146-151.
136. Messner M, Hardeland R, Rodenbeck A, Huether G. Tissue retention and subcellular distribution of continuously infused melatonin in rats under near physiological conditions. *Journal of pineal research* 1998;25(4):251-259.

137. Bubenik G, Pang S, Cockshut J, et al. Circadian variation of portal, arterial and venous blood levels of melatonin in pigs and its relationship to food intake and sleep. *Journal of pineal research* 2000;28(1):9-15.
138. Bubenik GA, Ball RO, Pang SF. The effect of food deprivation on brain and gastrointestinal tissue levels of tryptophan, serotonin, 5 - hydroxyindoleacetic acid, and melatonin. *Journal of pineal research* 1992;12(1):7-16.
139. Chik C, Ho A, Brown G. Effect of food restriction on 24-h serum and pineal melatonin content in male rats. *European Journal of Endocrinology* 1987;115(4):507-513.
140. Mattison JA, Roth GS, Ingram DK, Lane MA. Endocrine effects of dietary restriction and aging: The National Institute on Aging study. *Journal of Anti-Aging Medicine* 2001;4(3):215-223.
141. Bubenik G. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal MEL. *J* [7].
142. Dubbels R, Reiter R, Klenke E, et al. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography - mass spectrometry. *Journal of pineal research* 1995;18(1):28-31.
143. Hattori A, Migitaka H, Iigo M, et al. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochemistry and molecular biology international* 1995;35(3):627-634.
144. Huether G. Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact of nutritional factors on circulating melatonin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994;719(1):146-158.
145. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2014;71(16):2997-3025. DOI: 10.1007/s00018-014-1579-2.
146. Bertrand PP, Bertrand RL, Camello PJ, Pozo MJ. Simultaneous measurement of serotonin and melatonin from the intestine of old mice: the effects of daily melatonin supplementation. *J Pineal Res* 2010;49(1):23-34. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2010.00760.x.
147. Diss LB, Robinson SD, Wu Y, Fidalgo S, Yeoman MS, Patel BA. Age-related changes in melatonin release in the murine distal colon. *ACS Chem Neurosci* 2013;4(5):879-87. DOI: 10.1021/cn4000617.
148. Dillon DC, Easley SE, Asch BB, et al. Differential expression of high-affinity melatonin receptors (MT1) in normal and malignant human breast tissue. *American journal of clinical pathology* 2002;118(3):451-458.
149. Lanoix D, Ouellette R, Vaillancourt C. Expression of melatoninergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. *Human Reproduction* 2006;21(8):1981-1989.
150. Nakamura E, Kozaki Ki, Tsuda H, et al. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1 A (MTNR1A) in oral squamous - cell carcinoma. *Cancer science* 2008;99(7):1390-1400.
151. Carbajo - Pescador S, Martín - Renedo J, García - Palomo A, Tuñón MJ, Mauriz JL, González - Gallego J. Changes in the expression of melatonin receptors induced by melatonin treatment in hepatocarcinoma HepG2 cells. *Journal of pineal research* 2009;47(4):330-338.

152. Hardeland R. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors* 2009;35(2):183-192.
153. Jockers R, Maurice P, Boutin J, Delagrangé P. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *British journal of pharmacology* 2008;154(6):1182-1195.
154. Carlberg C. Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:387-96. (In eng). DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05403.x.
155. Becker-André M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269(46):28531-28534.
156. Garcia-Mauriño S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *Journal of neuroimmunology* 1998;92(1-2):76-84.
157. Carrillo-Vico A, Reiter RJ, Lardone PJ, et al. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Current opinion in investigational drugs* 2006;7(5):423.
158. Benitez-King G, Huerto-Delgado L, Anton-Tay F. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life sciences* 1993;53(3):201-207.
159. Macías M, Escames G, Leon J, et al. Calreticulin–melatonin: An unexpected relationship. *European journal of biochemistry* 2003;270(5):832-840.
160. Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn TF. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *Faseb j* 2004;18(7):869-71. (In eng). DOI: 10.1096/fj.03-1031fje.
161. Hardeland R, Poeggeler B, Pappolla M. New vistas on mitochondrial electron flux rates and aging. *Cell* 2008;132:171-6.
162. Dubocovich ML. Luzindole (N-0774): a novel melatonin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;246(3):902-10. (In eng).
163. Browning C, Beresford I, Fraser N, Giles H. Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt(1) and MT(2) receptors. *Br J Pharmacol* 2000;129(5):877-86. (In eng). DOI: 10.1038/sj.bjp.0703130.
164. Luo Y, Yang Y, Shen Y, et al. Luzindole attenuates LPS/d-galactosamine-induced acute hepatitis in mice. *Innate Immunity* 2020;26(4):319-327. DOI: 10.1177/1753425919890912.
165. Dubocovich ML, Mogilnicka E, Areso PM. Antidepressant-like activity of the melatonin receptor antagonist, luzindole (N-0774), in the mouse behavioral despair test. *European Journal of Pharmacology* 1990;182(2):313-325. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(90\)90290-M](https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)90290-M).
166. Tricoire H, Moller M, Chemineau P, Malpoux B. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-SUPPLEMENT-* 2003:311-321.
167. Hardeland R, Poeggeler B. Actions of melatonin, its structural and functional analogs in the central nervous system and the significance of metabolism. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)* 2007;7(4):289-303.
168. Hardeland R. Melatonin metabolism in the central nervous system. *Current neuropharmacology* 2010;8(3):168-181.

169. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in neurobiology* 2008;85(3):335-353.
170. Richter HG, Torres-Farfan C, Garcia-Sesnich J, et al. Rhythmic expression of functional MT1 melatonin receptors in the rat adrenal gland. *Endocrinology* 2008;149(3):995-1003.
171. Torres-Farfan C, Richter HG, Rojas-García P, et al. mt1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003;88(1):450-458.
172. Cardinali DP, Pandi-Perumal S, Niles LP. Melatonin and its receptors: biological function in circadian sleep-wake regulation. *Neurochemistry of sleep and wakefulness/Eds.: JM Monty, SR Pandi-Perumal, CM ...; 2008.*
173. Solmaz I, Gürkanlar D, Gökçil Z, Göksoy C, Özkan M, Erdoğan E. Antiepileptic activity of melatonin in guinea pigs with pentylenetetrazol-induced seizures. *Neurological Research* 2009;31(9):989-995.
174. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Spence DW, et al. Potential use of melatonergic drugs in analgesia: mechanisms of action. *Brain research bulletin* 2010;81(4-5):362-371.
175. Ulugol A, Dokmeci D, Guray G, Sapolyo N, Ozyigit F, Tamer M. Antihyperalgesic, but not antiallodynic, effect of melatonin in nerve-injured neuropathic mice: possible involvements of the L-arginine–NO pathway and opioid system. *Life sciences* 2006;78(14):1592-1597.
176. Papp M, Litwa E, Gruca P, Mocaër E. Anxiolytic-like activity of agomelatine and melatonin in three animal models of anxiety. *Behavioural pharmacology* 2006;17(1):9-18.
177. Adi N, Mash DC, Ali Y, Singer C, Shehadeh L, Papapetropoulos S. Melatonin MT1 and MT2 receptor expression in Parkinson's disease. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 2010;16(2):BR61-7.
178. Brunner P, Jockers R, Ravid R, Angeloni D, Fraschini F. Pineal and cortical melatonin receptors MT1 and MT2 are decreased in Alzheimer's disease. *European Journal of Histochemistry* 2006;50(4):311-316.
179. P Cardinali D, M Furio A, I Brusco L. Clinical aspects of melatonin intervention in Alzheimer's disease progression. *Current Neuropharmacology* 2010;8(3):218-227.
180. Das A, McDowell M, Pava MJ, et al. The inhibition of apoptosis by melatonin in VSC4. 1 motoneurons exposed to oxidative stress, glutamate excitotoxicity, or TNF - α toxicity involves membrane melatonin receptors. *Journal of pineal research* 2010;48(2):157-169.
181. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best practice & research clinical endocrinology & metabolism* 2003;17(2):273-285.
182. Konturek PC, Konturek S, Brzozowski T, et al. Gastroprotective activity of melatonin and its precursor, L-tryptophan, against stress-induced and ischaemia-induced lesions is mediated by scavenge of oxygen radicals. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1997;32(5):433-438.

183. Lu W-Z, Song G-H, Gwee K-A, Ho K-Y. The effects of melatonin on colonic transit time in normal controls and IBS patients. *Digestive diseases and sciences* 2009;54:1087-1093.
184. Matheus N, Mendoza C, Iceta R, Mesonero JE, Alcalde AI. Melatonin inhibits serotonin transporter activity in intestinal epithelial cells. *Journal of pineal research* 2010;48(4):332-339.
185. Benouali - Pellissier S. Melatonin is involved in cholecystokinin - induced changes of ileal motility in rats. *Journal of pineal research* 1994;17(2):79-85.
186. Kasimay Ö, Cakir B, Devseren E, Yegen B. Exogenous melatonin delays gastric emptying rate. *Journal of physiology and pharmacology* 2005;56(4):543-553.
187. Barajas-López C, Peres AL, Espinosa-Luna R, Reyes-Vázquez C, Prieto-Gómez B. Melatonin modulates cholinergic transmission by blocking nicotinic channels in the guinea-pig submucous plexus. *European journal of pharmacology* 1996;312(3):319-325.
188. Reyes - Vázquez C, Naranjo - Rodríguez E, García - Segoviano J, Trujillo - Santana J, Prieto - Gómez B. Apamin blocks the direct relaxant effect of melatonin on rat ileal smooth muscle. *Journal of pineal research* 1997;22(1):1-8.
189. De Filippis D, Iuvone T, Esposito G, et al. Melatonin reverses lipopolysaccharide - induced gastro - intestinal motility disturbances through the inhibition of oxidative stress. *Journal of pineal research* 2008;44(1):45-51.
190. Legris GJ, Will PC, Hopfer U. Inhibition of amiloride-sensitive sodium conductance by indoleamines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(6):2046-50. DOI: 10.1073/pnas.79.6.2046.
191. Lee P, Shiu S, Chow P, Pang S. Regional and Diurnal Studies of Melatonin and Melatonin Binding Sites in the Duck Gastro-Intestinal Tract. *Neurosignals* 1995;4(4):212-224.
192. Mrnka L, Hock M, Rybová M, Pácha J. Melatonin inhibits prostaglandin E2- and sodium nitroprusside-induced ion secretion in rat distal colon. *European journal of pharmacology* 2008;581(1-2):164-170.
193. Chan H, Lui K, Wong W, Poon A. Effect of melatonin on chloride secretion by human colonic T84 cells. *Life sciences* 1998;62(23):2151-2158.
194. Sjöblom M, Flemström G. Melatonin in the duodenal lumen is a potent stimulant of mucosal bicarbonate secretion. *Journal of pineal research* 2003;34(4):288-293.
195. Leja-Szpak A, Jaworek J, Tomaszewska R, et al. MELATONIN PRECURSOR, L-TRYPTOPHAN PROTECTS THE. *Journal of physiology and pharmacology* 2004;55(1):239-254.
196. Jaworek J, Konturek S, Leja-Szpak A, et al. ROLE OF ENDOGENOUS MELATONIN AND ITS MT2 RECEPTOR. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2002;53(4):791-804.
197. Nishida S, Segawa T, Murai I, Nakagawa S. Long - term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty - acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of $\Delta - 5$ desaturase activity. *Journal of pineal research* 2002;32(1):26-33.

198. Wajs E, Lewinski A. Melatonin and N-acetylserotonin-two pineal indoleamines inhibiting the proliferation of jejunal epithelial cells in rats. *Med Sci Res* 1988;16:1125-1126.
199. Callaghan BD. The long - term effect of pinealectomy on the crypts of the rat gastrointestinal tract. *Journal of pineal research* 1995;18(4):191-196.
200. Pawlikowski M. The pineal gland and cell proliferation. *Adv Pineal Res* 1986;1:27-30.
201. Bogoeva M, Mileva M, Tsanova K. Effect of exogenous melatonin on the twenty-four-hour mitotic activity of some normal mouse tissues. *COMPTEs RENDUS-ACADEMIE BULGARE DES SCIENCES* 1993;46:107-107.
202. Pentney PT, Bubenik GA. Melatonin reduces the severity of dextran - induced colitis in mice. *Journal of pineal research* 1995;19(1):31-39.
203. Zerek-Meleń G, Lewiński A, Kułak J. The opposite effect of high and low doses of melatonin upon mitotic activity of the mouse intestinal epithelium. *Endokrynologia Polska* 1987;38(4):317-323.
204. Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Current topics in medicinal chemistry* 2002;2(2):167-179.
205. Naranjo M, Guerrero J, Rubio A, et al. Melatonin biosynthesis in the thymus of humans and rats. *Cellular and molecular life sciences* 2007;64:781-790.
206. Cardinali DP, Esquifino AI, Srinivasan V, Pandi-Perumal SR. Melatonin and the immune system in aging. *Neuroimmunomodulation* 2008;15(4-6):272-278.
207. Carrillo-Vico A, Garcia-Perganeda A, Naji L, Calvo J, Romero M, Guerrero J. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2003;60:2272-2278.
208. Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Molinero P, Rubio A, Guerrero J. A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2009;66:516-525.
209. Castrillon P, Cardinali D, Pazo D, Cutrera R, Esquifino A. Effect of Superior Cervical Ganglionectomy on 24 - h Variations in Hormone Secretion from the Anterior Hypophysis and in Hypothalamic Monoamine Turnover During the Preclinical Phase of Freund's Adjuvant Arthritis in Rats. *Journal of Neuroendocrinology* 2001;13(3):288-295.
210. Carrillo - Vico A, García - Mauriño S, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE2 on IL - 2 production in human lymphocytes via its mt1 membrane receptor. *The FASEB Journal* 2003;17(6):755-757.
211. Barjavel MJ, Mamdouh Z, Raghbate N, Bakouche O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *The Journal of Immunology* 1998;160(3):1191-1197.
212. García-Mauriño S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life sciences* 1999;65(20):2143-2150.
213. Černyšiov V, Gerasimčik N, Mauricas M, Girkontaitė I. Regulation of T-cell-independent and T-cell-dependent antibody production by circadian rhythm and melatonin. *International immunology* 2010;22(1):25-34.

214. Santello FH, Frare EO, Dos Santos CD, Caetano LC, Alonso Toldo MP, do Prado Jr JC. Suppressive action of melatonin on the TH - 2 immune response in rats infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of pineal research* 2008;45(3):291-296.
215. Carrillo - Vico A, Lardone PJ, Naji L, et al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro - /anti - inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti - apoptotic effects. *Journal of pineal research* 2005;39(4):400-408.
216. Baykal A, Iskit AB, Hamaloglu E, Guc MO, Hascelik G, Sayek I. Melatonin modulates mesenteric blood flow and TNFalpha concentrations after lipopolysaccharide challenge. *The European journal of surgery* 2000;166(9):722-727.
217. Park HJ, Kim HJ, Ra J, et al. Melatonin inhibits lipopolysaccharide - induced CC chemokine subfamily gene expression in human peripheral blood mononuclear cells in a microarray analysis. *Journal of pineal research* 2007;43(2):121-129.
218. Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González - Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin' s anti - inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *Journal of pineal research* 2013;54(1):1-14.
219. Steinhilber D, Brungs M, Werz O, et al. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human b lymphocytes (*). *Journal of Biological Chemistry* 1995;270(13):7037-7040.
220. Deng W-G, Tang S-T, Tseng H-P, Wu KK. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood* 2006;108(2):518-524.
221. Cardinali DP, Ritta MN. The role of prostaglandins in neuroendocrine junctions: studies in the pineal gland and the hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1983;36(2):152-160.
222. Veneroso C, Tuñón MJ, González - Gallego J, Collado PS. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *Journal of pineal research* 2009;47(2):184-191.
223. Ochoa JJ, Díaz - Castro J, Kajarabille N, et al. Melatonin supplementation ameliorates oxidative stress and inflammatory signaling induced by strenuous exercise in adult human males. *Journal of pineal research* 2011;51(4):373-380.
224. Bekyarova G, Tancheva S, Hristova M. Protective effect of melatonin against oxidative hepatic injury after experimental thermal trauma. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2009;31(1):11-4.
225. Mohan N, Sadeghi K, Reiter RJ, Meltz ML. The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa B. *Biochemistry and molecular biology international* 1995;37(6):1063-1070.
226. Tan D-X. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr j* 1993;1:57-60.

227. Barlow-Walden L, Reiter R, Abe M, et al. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochemistry international* 1995;26(5):497-502.
228. Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, et al. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochemistry international* 1998;32(1):69-75.
229. Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman AL, Szabó C. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life sciences* 1997;60(10):PL169-PL174.
230. Noda Y, Mori A, Liburdy R, Packer L. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. *Journal of pineal research* 1999;27(3):159-163.
231. Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuña - Castroviejo D, Guerrero JM. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *Journal of pineal research* 1996;20(4):205-210.
232. Reiter RJ, Tan D-X, Maldonado MD. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *Journal of pineal research* 2005;39(2):215-216.
233. Hardeland R, Tan DX, Reiter RJ. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *Journal of pineal research* 2009;47(2):109-126.
234. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 2003;552(2):335-344.
235. Lane N. Mitochondrial disease: powerhouse of disease. *Nature* 2006;440(7084):600-603.
236. López A, García JA, Escames G, et al. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *Journal of pineal research* 2009;46(2):188-198.
237. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, EL - SAWI MR. Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration: implications for aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;959(1):238-250.
238. Zatta P, Tognon G, Carampin P. Melatonin prevents free radical formation due to the interaction between β - amyloid peptides and metal ions [Al (III), Zn (II), Cu (II), Mn (II), Fe (II)]. *Journal of pineal research* 2003;35(2):98-103.
239. Karbownik M, Reiter RJ. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation (44547). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 2000;225(1):9-22.
240. Reiter RJ, Tan D-x, Sainz RM, Mayo JC. Melatonin protects the heart against both ischemia/reperfusion injury and chemotherapeutic drugs. *Cardiovascular drugs and therapy* 2002;16(1):5.
241. Jaworek J, Brzozowski T, Konturek SJ. Melatonin as an organoprotector in the stomach and the pancreas. *Journal of pineal research* 2005;38(2):73-83.
242. Tengattini S, Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Rodella LF, Rezzani R. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *Journal of pineal research* 2008;44(1):16-25.
243. Wang X. The antiapoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases. *CNS neuroscience & therapeutics* 2009;15(4):345-357.

244. Brydon L, Petit L, Delagrangé P, Strosberg AD, Jockers R. Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. *Endocrinology* 2001;142(10):4264-4271.
245. Tan DX, Manchester L, Fuentes - Broto L, Paredes S, Reiter R. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obesity reviews* 2011;12(3):167-188.
246. Sharkey JT, Puttaramu R, Word RA, Olcese J. Melatonin synergizes with oxytocin to enhance contractility of human myometrial smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009;94(2):421-427.
247. Ekmekcioglu C, Thalhammer T, Humpeler S, et al. The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. *Journal of pineal research* 2003;35(1):40-44.
248. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT 1 and MT 2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 2005;27:101-110.
249. Umit UM, Berna T, Handan K, et al. Role of melatonin and luzindole in rat mammary cancer. *J Invest Surg* 2012;25(6):345-53. (In eng). DOI: 10.3109/08941939.2012.665570.
250. Samanta S. Melatonin: an endogenous miraculous indolamine, fights against cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol* 2020;146(8):1893-1922. (In eng). DOI: 10.1007/s00432-020-03292-w.
251. Lu YZ, Wu CC, Huang YC, et al. Neutrophil priming by hypoxic preconditioning protects against epithelial barrier damage and enteric bacterial translocation in intestinal ischemia/reperfusion. *Lab Invest* 2012;92(5):783-96. DOI: 10.1038/labinvest.2012.11.
252. Yananli HR. Motor Aktivitenin Değerlendirilmesi. In: Ozbeyli D, Gulhan R, eds. *Deneysel Araştırma Modelleri Uygulama El Kitabı: Ankara Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.*; 2021:349-358.
253. File SE. Effects of chlorpromazine on exploration and habituation in the rat. *Br J Pharmacol* 1973;49(2):303-10. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1973.tb08376.x.
254. Unluer EE, Alican I, Yegen C, Yegen BC. The delays in intestinal motility and neutrophil infiltration following burn injury in rats involve endogenous endothelins. *Burns* 2000;26(4):335-40. DOI: 10.1016/s0305-4179(99)00135-7.
255. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8(9):871-4. DOI: 10.1016/0019-2791(71)90454-x.
256. Şen LS, Karakoyun B, Yeğen C, et al. Treatment with either obestatin or ghrelin attenuates mesenteric ischemia–reperfusion-induced oxidative injury of the ileum and the remote organ lung. *Peptides* 2015;71:8-19.
257. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982;78(3):206-9. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12506462.
258. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-10. DOI: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6.
259. Haklar G, Sayin-Ozveri E, Yuksel M, Aktan AO, Yalcin AS. Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast

- tumors. *Cancer Lett* 2001;165(2):219-24. DOI: 10.1016/s0304-3835(01)00421-9.
260. Haklar U, Yuksel M, Velioglu A, Turkmen M, Haklar G, Yalcin AS. Oxygen radicals and nitric oxide levels in chondral or meniscal lesions or both. *Clin Orthop Relat Res* 2002(403):135-42. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360019>).
 261. Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS, Burgess JG. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J Microbiol Methods* 2011;86(3):351-6. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.06.010.
 262. Mrnka L, Hock M, Rybová M, Pácha J. Melatonin inhibits prostaglandin E2- and sodium nitroprusside-induced ion secretion in rat distal colon. *European Journal of Pharmacology* 2008;581(1):164-170. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.031>.
 263. Golombek DA, Pévet P, Cardinali DP. Melatonin effects on behavior: possible mediation by the central GABAergic system. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 1996;20(3):403-412.
 264. Tilden AR, Brauch R, Ball R, et al. Modulatory effects of melatonin on behavior, hemolymph metabolites, and neurotransmitter release in crayfish. *Brain research* 2003;992(2):252-262.
 265. Alghamdi BS. The Effect of Melatonin and Exercise on Social Isolation-Related Behavioral Changes in Aged Rats. *Front Aging Neurosci* 2022;14:828965. (In eng). DOI: 10.3389/fnagi.2022.828965.
 266. Park K, Lee Y, Park S, et al. Synergistic effect of melatonin on exercise-induced neuronal reconstruction and functional recovery in a spinal cord injury animal model. *J Pineal Res* 2010;48(3):270-281. (In eng). DOI: 10.1111/j.1600-079X.2010.00751.x.
 267. Barbosa-Méndez S, Pérez-Sánchez G, Becerril-Villanueva E, Salazar-Juárez A. Melatonin decreases cocaine-induced locomotor sensitization and cocaine-conditioned place preference in rats. *J Psychiatr Res* 2021;132:97-110. (In eng). DOI: 10.1016/j.jpsychires.2020.09.027.
 268. Takagi H, Ando T, Umemoto T. Perioperative depression or anxiety and postoperative mortality in cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. *Heart Vessels* 2017;32(12):1458-1468. (In eng). DOI: 10.1007/s00380-017-1022-3.
 269. Satyanarayanan SK, Chien YC, Chang JP, et al. Melatonergic agonist regulates circadian clock genes and peripheral inflammatory and neuroplasticity markers in patients with depression and anxiety. *Brain Behav Immun* 2020;85:142-151. (In eng). DOI: 10.1016/j.bbi.2019.03.003.
 270. Madsen BK, Zetner D, Møller AM, Rosenberg J. Melatonin for preoperative and postoperative anxiety in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2020;12(12):Cd009861. (In eng). DOI: 10.1002/14651858.CD009861.pub3.
 271. Ozacmak VH, Sayan H, Arslan SO, Altaner S, Aktas RG. Protective effect of melatonin on contractile activity and oxidative injury induced by ischemia and reperfusion of rat ileum. *Life Sci* 2005;76(14):1575-88. (In eng). DOI: 10.1016/j.lfs.2004.08.031.

272. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991;91(3c):14s-22s. (In eng). DOI: 10.1016/0002-9343(91)90279-7.
273. Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. *Front Physiol* 2014;5:377. (In eng). DOI: 10.3389/fphys.2014.00377.
274. Qi W, Tan DX, Reiter RJ, et al. Melatonin reduces lipid peroxidation and tissue edema in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 1999;44(11):2257-62. (In eng). DOI: 10.1023/a:1026656720868.
275. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001;426(1-2):1-10. (In eng). DOI: 10.1016/s0014-2999(01)01175-x.
276. Paskaloğlu K, Sener G, Kapucu C, Ayanoğlu-Dülger G. Melatonin treatment protects against sepsis-induced functional and biochemical changes in rat ileum and urinary bladder. *Life Sci* 2004;74(9):1093-104. (In eng). DOI: 10.1016/j.lfs.2003.07.038.
277. Ahmed O, Farid A, Elamir A. Dual role of melatonin as an anti-colitis and anti-extra intestinal alterations against acetic acid-induced colitis model in rats. *Sci Rep* 2022;12(1):6344. (In eng). DOI: 10.1038/s41598-022-10400-y.
278. Hardeland R. Melatonin and inflammation-Story of a double-edged blade. *J Pineal Res* 2018;65(4):e12525. (In eng). DOI: 10.1111/jpi.12525.
279. Mei Q, Diao L, Xu JM, Liu XC, Jin J. A protective effect of melatonin on intestinal permeability is induced by diclofenac via regulation of mitochondrial function in mice. *Acta Pharmacol Sin* 2011;32(4):495-502. (In eng). DOI: 10.1038/aps.2010.225.
280. Gülben K, Ozdemir H, Berberoğlu U, et al. Melatonin modulates the severity of taurocholate-induced acute pancreatitis in the rat. *Dig Dis Sci* 2010;55(4):941-6. (In eng). DOI: 10.1007/s10620-009-0808-2.
281. Vriend J, Reiter RJ. Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome. *J Pineal Res* 2015;58(1):1-11. (In eng). DOI: 10.1111/jpi.12189.
282. Scheving LA. Biological clocks and the digestive system. *Gastroenterology* 2000;119(2):536-49. (In eng). DOI: 10.1053/gast.2000.9305.
283. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002;418(6901):935-41. (In eng). DOI: 10.1038/nature00965.
284. Poirel VJ, Boggio V, Dardente H, Pevet P, Masson-Pevet M, Gauer F. Contrary to other non-photic cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* 2003;120(3):745-55. (In eng). DOI: 10.1016/s0306-4522(03)00344-0.
285. Peyric E, Moore HA, Whitmore D. Circadian clock regulation of the cell cycle in the zebrafish intestine. *PLoS One* 2013;8(8):e73209. (In eng). DOI: 10.1371/journal.pone.0073209.
286. Zeman M, Herichova I. Melatonin and clock genes expression in the cardiovascular system. *Front Biosci (Schol Ed)* 2013;5(2):743-53. (In eng). DOI: 10.2741/s404.

287. Eum SY, Schurhoff N, Teglas T, Wolff G, Toborek M. Circadian disruption alters gut barrier integrity via a β -catenin-MMP-related pathway. *Mol Cell Biochem* 2023;478(3):581-595. (In eng). DOI: 10.1007/s11010-022-04536-8.
288. Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *Biomed Res Int* 2017;2017:9351507. (In eng). DOI: 10.1155/2017/9351507.
289. Binda C, Lopetuso LR, Rizzatti G, Gibiino G, Cennamo V, Gasbarrini A. Actinobacteria: a relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. *Digestive and Liver Disease* 2018;50(5):421-428.
290. Zafar H, Saier MH, Jr. Gut Bacteroides species in health and disease. *Gut Microbes* 2021;13(1):1-20. (In eng). DOI: 10.1080/19490976.2020.1848158.
291. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *nature* 2011;473(7346):174-180.
292. Hou K, Wu Z-X, Chen X-Y, et al. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022;7(1):135. DOI: 10.1038/s41392-022-00974-4.
293. Shi Y, Cui H, Wang F, et al. Role of gut microbiota in postoperative complications and prognosis of gastrointestinal surgery: A narrative review. *Medicine (Baltimore)* 2022;101(29):e29826. (In eng). DOI: 10.1097/md.00000000000029826.
294. Chen J, Wang Y, Shi Y, Liu Y, Wu C, Luo Y. Association of gut microbiota with intestinal ischemia/reperfusion injury. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2022:953.
295. Iesanu MI, Zahiu CDM, Dogaru IA, et al. Melatonin-Microbiome Two-Sided Interaction in Dysbiosis-Associated Conditions. *Antioxidants (Basel)* 2022;11(11) (In eng). DOI: 10.3390/antiox11112244.
296. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol* 2015;33(9):496-503. (In eng). DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.06.011.
297. Litvak Y, Byndloss MX, Tsohis RM, Bäumlner AJ. Dysbiotic Proteobacteria expansion: a microbial signature of epithelial dysfunction. *Curr Opin Microbiol* 2017;39:1-6. (In eng). DOI: 10.1016/j.mib.2017.07.003.
298. Tojo R, Suárez A, Clemente MG, et al. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol* 2014;20(41):15163-76. (In eng). DOI: 10.3748/wjg.v20.i41.15163.