

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İN VİTRO SIÇAN MESANE KASILMALARI ÜZERİNE  
MELATONİN RESEPTÖRLERİNİN ROLÜ**

Fatma Nur TAKI

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman  
Prof. Dr. Selim KUTLU

KONYA 2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İN VİTRO SIÇAN MESANE KASILMALARI ÜZERİNE  
MELATONİN RESEPTÖRLERİNİN ROLÜ**

Fatma Nur TAKI

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman  
Prof. Dr. Selim KUTLU

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 141418003 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2017

## TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Fatma Nur TAKI'nın "İn Vitro Sıçan Mesane Kasılmaları Üzerine Melatonin Reseptörlerinin Rolü" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya/31/05/2017

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Selim KUTLU

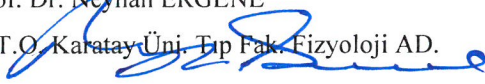
N.E.Ü. Meram Tıp Fak. Fizyoloji AD.



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Neyhan ERGENE

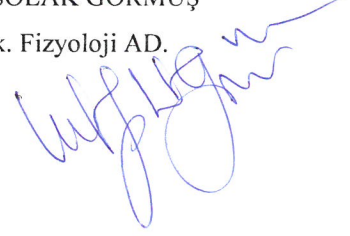
K.T.O. Karatay Üni. Tıp Fak. Fizyoloji AD.



Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Z. Işık SOLAK GÖRMÜŞ

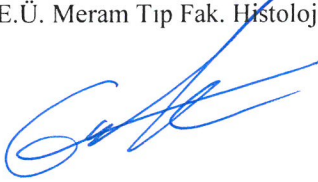
N.E.Ü. Meram Tıp Fak. Fizyoloji AD.



Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Gökhan CÜCE

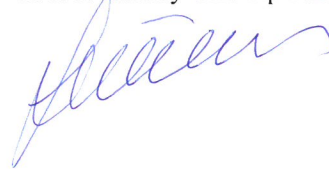
N.E.Ü. Meram Tıp Fak. Histoloji AD.



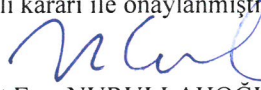
Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Füsün SUNAR

K.T.O. Karatay Üni. Tıp Fak. TEBAD AD.



Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 14/07/2017 tarih ve .....14..... / ...18. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

20.07/2017

## APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled "Effect Of Melatonin Receptors On İn Vitro Rat Bladder Contractions" by "Fatma Nur TAKI" that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of Master of Science in the Department of "Physiology", Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan

Konya/31/05/2017

Principal Advisor

Prof. Dr. Selim KUTLU

N.E.U. Meram Medical Faculty

Department of Physiology

Examination Committee

Prof. Dr. Neyhan ERGENE

K.T.O. Karatay Uni. Medical Faculty

Department of Physiology

Examination Committee

Associate Prof. Z. Işık SOLAK GÖRMÜŞ

N.E.U. Meram Medical Faculty

Department of Physiology

Examination Committee

Associate Prof. Gökhan CÜCE

N.E.U. Meram Medical Faculty

Department of Histology

Examination Committee

Associate Prof. Füsün SUNAR

K.T.O. Karatay Uni. Medical Faculty

Department of TEBAD

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

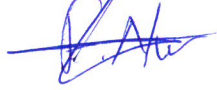
2.1.2017

## BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

31/05/2017

Fatma Nur TAKI



## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilimsel ve akademik tecrübeleriyle daima yol gösteren, tezin planlanması ve yürütülmesi aşamalarında sabır, özveri ve bilimsel desteğini esirgemeyen Saygıdeğer Danışman Hocam Prof. Dr. Selim KUTLU'ya, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim Kıymetli Hocam Prof. Dr. Neyhan ERGENE'ye, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen Sevgili Hocam Yrd. Doç. Dr. Z. Işık SOLAK GÖRMÜŞ'e ve asistan arkadaşlarıma teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Beni doğruluğu ve dürüstlüğu yaşam tarzım olarak benimseyecek şekilde yetiőtiren ve hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyip hiçbir zaman yalnız bırakmayan, bu hayattaki en büyük şansım olan değerli aileme sonsuz teşekkürler. Tezimi 141418003 no'lu proje ile destekleyen NEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğu'ne teşekkür ederim.

**Fatma Nur TAKI**  
**KONYA, 2017**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

<i>İç Kapak</i> .....	<i>i</i>
<i>Tez Onay Sayfası</i> .....	<i>ii</i>
<i>Approval</i> .....	<i>iii</i>
<i>Beyanat</i> .....	<i>iv</i>
<i>Teşekkür</i> .....	<i>v</i>
<i>İçindekiler</i> .....	<i>vi</i>
<i>Kısaltmalar ve Simgeler Listesi</i> .....	<i>ix</i>
<i>Şekiller Listesi</i> .....	<i>xi</i>
<i>Tablolar Listesi</i> .....	<i>xiii</i>
<i>Özet</i> .....	<i>xiv</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>xv</i>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Düz Kaslar Ve Düz Kaslarda Kasılma .....	3
2.1.1. Düz Kaslarda $Ca^{+2}$ , un Rolü.....	5
2.1.1.1. Lokal $Ca^{+2}$ salınma olayları.....	5
2.1.1.2. $Ca^{+2}$ kısılcımları ve puflar.....	6
2.1.1.3. Büyük $Ca^{+2}$ sinyalleşmesi ve kasılma .....	7
2.1.1.4. Lokal $Ca^{+2}$ sinyalleri ve uyarılabilirlik.....	8
2.1.1.5. $Cl_{Ca}$ kanalları ve $Ca^{+2}$ sinyalleşmesi.....	10
2.2. Mesane Düz Kasında Kasılma Mekanizması.....	11

2.2.1. Membran Eksitasyonu.....	13
2.2.1.1. Dinlenme potansiyeli ve aksiyon potansiyeli.....	13
2.2.1.2. Ca <sup>+2</sup> kanalları.....	14
2.2.1.3. K kanalları .....	15
2.2.1.4. Gerim aktiveli kanallar .....	17
2.2.1.5. Ligand aktiviteli kanallar .....	18
2.3. Melatonin .....	18
2.3.1. Melatonin Biyosentezi.....	18
2.3.1.1. Melatonin etki mekanizması .....	19
2.3.2. Melatonin Reseptörleri .....	22
2.3.2.1. G proteini ile birleşen melatonin reseptörleri.....	25
2.3.2.2. Melatonin reseptörleri sinyalleşmesi.....	26
2.3.2.3. Melatonin reseptörleri ve kontraksiyon.....	29
2.3.2.4. Melatonin reseptör agonistleri.....	30
2.3.2.5. Melatonin reseptör antagonistleri.....	31
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>32</b>
3.1. Deney Hayvanlarının Bakım Ve Beslenmeleri .....	32
3.2. Krebs Solüsyonu .....	33
3.3. İzole Organ Banyosu Sistemi.....	33
3.3.1. Organ Banyosu .....	34
3.3.2. O <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> Karışım Tüpü (HABAS).....	34
3.3.3. Termostatlı Dolaşım Pompası .....	35
3.3.4. Amplifikatör .....	35



3.3.5. Kayıt Ünitesi .....	35
3.4. Mesane Şeritlerinin Hazırlanması .....	36
3.5. Agomelatinin Hazırlanması.....	37
3.5.1. Agomelatin Uygulaması İçin Deney Protokolü .....	37
3.6. Melatoninin Hazırlanması .....	38
3.6.1. Melatonin Uygulaması İçin Deney Protokolü.....	38
3.7. 4P-PDOTun Hazırlanması.....	39
3.7.1. 4P-PDOT Uygulaması İçin Deney Protokolü .....	40
3.8. İstatistiksel Metot .....	41
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>42</b>
4.1. Agomelatin Protokol Grubu Bulguları .....	42
4.2. Melatonin Protokol Grubu Bulguları .....	44
4.3. 4P-PDOT Protokol Grubu Bulguları.....	47
<b>5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>51</b>
<b>6.KAYNAKLAR .....</b>	<b>53</b>
<b>7.ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>63</b>
<b>8.EKLER.....</b>	<b>64</b>

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

<b>5-HT</b>	: 5-hidroksitriptamin
<b>AC</b>	: Adenilat siklaz
<b>ACh</b>	: Asetilkolin
<b>ADP</b>	: Adenozin difosfat
<b>AR</b>	: Adrenoreseptör
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>BK</b>	: Büyük iletkenlikli kanal
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>CaM</b>	: Kalmodulin
<b>CaMK</b>	: Kalmodulin kinazlar
<b>cAMP</b>	: Siklik adenozin monofosfat
<b>cGMP</b>	: Siklik guanilin monofosfat
<b>CICR</b>	: Ca <sup>+2</sup> - indüklenmiş Ca <sup>+2</sup> salınımı
<b>Cl<sub>Ca<sup>+2</sup></sub></b>	: Ca <sup>+2</sup> -aktifli Cl kanalları
<b>CPA</b>	: Siklopiazonik asit
<b>CREB</b>	: cAMP yanıt elementi bağlayan protein
<b>DAG</b>	: Diaçil gliserol
<b>ER</b>	: Endoplazmik retikulumu
<b>GC</b>	: Guanilat siklaz
<b>GIRK</b>	: Kir3 içe doğrultucu K <sup>+</sup> kanalları
<b>IP<sub>3</sub></b>	: IP <sub>3</sub> reseptörü
<b>IP<sub>3</sub></b>	: İnozitol 1, 4, 5-trifosfat
<b>K<sub>Ca<sup>+2</sup></sub></b>	: Ca <sup>+2</sup> -aktifli K <sup>+</sup> kanalları
<b>KCl</b>	: Potasyum Klorür
<b>Kir</b>	: İçe doğrultucu K <sup>+</sup> kanalları
<b>MHZ</b>	: Miyozin hafif zinciri
<b>MHZK</b>	: Miyozin hafif zincir kinazı
<b>MHZF</b>	: Miyozin hafif zincir fosfataz
<b>MT1</b>	: Melatonin 1 reseptörü
<b>MT2</b>	: Melatonin 2 reseptörü
<b>NO</b>	: Nitrik oksit

<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentaz
<b>PDE</b>	: Fosfodiesteraz
<b>PIP<sub>2</sub></b>	: Fosfatidilinozitol
<b>PKA</b>	: Protein kinaz A
<b>PKC</b>	: Proteinkinaz C
<b>PLC</b>	: Fosfolipaz C
<b>PMCA</b>	: Plazma membran Ca <sup>+2</sup> -ATPaz'ı
<b>PT</b>	: Pars tuberalis
<b>RyR</b>	:Riyanodin reseptörü
<b>RyRs</b>	: Riyanodin reseptörleri
<b>RZR/ROR</b>	: Retinoid bağlantılı Orphan çekirdek hormon reseptör ailesi
<b>SCN</b>	: Suprakiazmatik nükleus
<b>SERCA</b>	: Sarkoplazmik retikulum Ca <sup>+2</sup> -ATPaz'ı
<b>SOCE</b>	: Depo ilişkili Ca <sup>+2</sup> girişi
<b>SOCs</b>	: Depo ilişkili Ca <sup>+2</sup> kanalları
<b>SR</b>	:Sarkoplazmik retikulum
<b>STOC</b>	: Spontan geçici dışa doğru akım
<b>TEA</b>	: Tetraetilamonyum
<b>VBCC</b>	: Voltaj bağımlı Ca <sup>+2</sup> kanalları

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa No

Şekil 2.1. Detrusor düz kas kontraksiyonlarının muskarinik reseptör ve $\beta$ -adenoreseptörler tarafından düzenlenmesi.....	12
Şekil 2.2. Gözden pineal beze nörolojik yolak. Adrenerjik uyarıdan sonra melatoninin pinealositde intraselüler sentezi ve etkisi.....	20
Şekil 2.3. Mesane işlevinin düzenlenmesinde rol oynayan PKC sinyal yolları.....	30
Şekil 3.1. İzole organ banyosu sistemi.....	34
Şekil 3.2. İzole organ banyosu kayıt sisteminde kontraksiyonların görüntülenmesi ve kaydedilmesi.....	35
Şekil 3.3. Mesane düz kas şeritlerinin hazırlanması.....	36
Şekil 3.4. İzole organ banyosuna yerleştirilmiş mesane düz kas şeridi.....	37
Şekil 4.1. Agomelatin protokol grubunda ACh ile indüklenmiş mesane kasılmalarının genlik üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.2. Agomelatin dozlarının ACh ile indüklenmiş mesane kasılmalarında genlik üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.3. Agomelatin dozlarının ACh ile indüklenmiş in vitro sıçan mesane düz kas kontraktilitesi üzerine etkisini gösteren orijinal trase.....	44
Şekil 4.4. Melatonin protokol grubunda ACh ile indüklenmiş mesane kasılmalarının genlik üzerine etkisi.....	46
Şekil 4.5. Melatonin dozlarının ACh ile indüklenmiş mesane kasılmalarında genlik üzerine etkisi.....	47
Şekil 4.6. Melatonin dozlarının ACh ile indüklenmiş in vitro sıçan mesane düz kas kontraktilitesi üzerine etkisini gösteren orijinal trase.....	47
Şekil 4.7. 4P-PDOT protokol grubunda ACh ile indüklenmiş mesane kasılmalarının genlik üzerine etkisi.....	48

**Şekil 4.8.** 4P-PDOT dozlarının ACh ile indüklenmiş mesane kasılmalarında genlik üzerine etkisi.....49

**Şekil 4.9.** 4P-PDOT dozlarının ACh ile indüklenmiş in vitro sıçan mesane düz kas kontraktilitesi üzerine etkisini gösteren orijinal trase.....50



## TABLolar LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Tablo 3.1.</b> Kullanılan sıçan yeminin içeriği (g/kg).....	32
<b>Tablo 3.2.</b> Krebs solüsyonu içeriği mM/L olarak yukarıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmış olup pH 7.4'e ayarlanmıştır.....	33
<b>Tablo 4.1.</b> Agomelatindeney grubunda ikilip değeriinin karşılaştırılması.....	43
<b>Tablo 4.2.</b> Melatonin deney grubunda ikili p değeriinin karşılaştırılması.....	46
<b>Tablo 4.3.</b> 4P-PDOT deney grubunda ikili p değeriinin karşılaştırılması.....	49

## ÖZET

T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### İN VİTRO SIÇAN MESANE KASILMALARI ÜZERİNE MELATONİN RESEPTÖRLERİNİN ROLÜ

Fatma Nur TAKI

Fizyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2017

**Amaç:** Bu tez çalışmasının amacı, in vitro mesane kasılmaları üzerine melatonin reseptörlerinin olası etkilerinin ve bu etkilerin meydana gelmesinde reseptör agonist ve antagonistinin rollerinin araştırılmasıdır.

**Yöntem:** Deneysel çalışmalar, Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmada Wistar cinsi 5-6 aylık, 200–250 g arası 24 adet dişi sıçan kullanıldı. Eter sedasyonunu takiben servikal dislokasyon yöntemi ile sıçanlar ötenazi edildi. Abdomen medyan hattın açılarak mesane çıkarıldı ve Krebs solüsyonu içine alındı. Mesane boyun kısmından apex yönünde longitudinal bir kesi ile açılarak mesaneden vertikal yönde 2X10 mm ebadında iki kas şeridi hazırlandı. Şeritler izole organ banyosundaki cam haznelere içerisindeki düzeneğe 1 g gerim uygulanarak yerleştirildi. Kas şeritlerine melatonin, melatonin reseptör agonist ve antagonist ve bunların çözücülerini kümülatif olarak uygulandı. 45 dakikalık bir uyum periyodunu takiben spontan kasılma gösteren bütün mesane şeritlerine  $10^{-5}$  M asetilkolin (ACh) uygulanarak kasılmalar indüklendi. Kümülatif olarak agomelatin ( $10^{-8}$  M- $10^{-3}$  M), melatonin (0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 2.5 mM) ve melatonin 2 reseptör antagonisti 4PPDOT (0.01 mM, 0.1 mM) uygulamaları yapıldı ve genlik üzerinde oluşan etkiler kayıt altına alındı.

**Bulgular:** Agomelatin  $10^{-8}$  M- $10^{-5}$  M doz aralığında uygulanmasıyla önemli bir etki oluşmazken,  $10^{-4}$  M ve  $10^{-3}$  M dozlarında istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon gözlemlendi ( $p<0.01$  ve  $p<0.001$ , sırasıyla,  $n=7$ ). Melatonin benzer şekilde, 0.01 mM ve 0.1 mM dozlarının ACh ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyonları üzerine etkili olmadığı fakat 1 mM ve 2.5 mM dozlarında kontraksiyonları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi ( $p<0.001$ ). 0,01 mM ve 0.1 mM 4P-PDOT ise 2 mM melatonin uygulanmasıyla oluşan inhibisyonu geri döndürmedi.

**Sonuç:** Agomelatin ve melatonin in vitro sıçan mesane düz kas kontraksiyonları üzerinde belirgin inhibitör etki göstermektedir. Bu etkiler doz bağımlı olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak 4P-PDOT in vitro sıçan mesane düz kas kontraksiyonlarını etkilememektedir. Bu da mesane kasılmaları üzerindeki melatoninin oluşturduğu inhibisyonun muhtemelen melatonin 2 reseptörü aracılığıyla ortaya çıkmadığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Agomelatin; Melatonin; Mesane; Sıçan; 4P-PDOT.

## ABSTRACT

T.C. NECMETTIN ERBAKAN UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

### EFFECT OF MELATONIN RECEPTORS ON IN VITRO RAT BLADDER CONTRACTIONS

Fatma Nur TAKI

Department of Physiology

PHD THESIS / KONYA-2017

**Aim:** The objective of this thesis was to investigate the possible effects of melatonin receptors on bladder contractions in vitro and roles of agonist and antagonist in emergence of these effects.

**Method:** Experimental studies were carried out in KONUDAM Experimental Medicine Research and Application Center and the Laboratory of Physiology Department in Necmettin Erbakan University. 24 female Wistar rats (5-6 month age) weighing 200-250 g have been used in this study. Rats were euthanized by cervical dislocation after light ether sedation. The abdomen was opened by median line and the bladder was removed and taken into the Krebs solution. The bladder was opened with a longitudinal incision in the direction of the apex from the neck to prepare two muscular strips of 2x10 mm in the vertical direction. The strips were placed by applying 1 g of tension to the assembly in the isolated organ bath. Melatonin, melatonin receptor agonist and antagonist and their solubilizers were cumulatively applied to the muscle strips in organ bath. Following a 45-minute equilibration period, tonic contractions were induced by application of acetylcholin (ACh) at  $10^{-5}$  M concentration. Agomelatin ( $10^{-8}$  M- $10^{-3}$  M), melatonin (0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 2.5 mM) and 4PPDOT (a selective melatonin receptor 2 antagonist, 0.01 mM, 0.1 mM) were applied and the effects on contraction amplitudes were recorded.

**Results:** Agomelatin had no effect between  $10^{-8}$  M and  $10^{-5}$  M level but there was significant inhibitory effect at the other doses ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively,  $n=7$ ). Similarly, there was no significant effect on bladder smooth muscle contractions after application of 0.01 mM and 0.1 mM melatonin concentrations, whereas melatonin administration both 1 mM and 2.5 mM significantly inhibited the contraction compared to control ( $p < 0.001$ ). 4P-PDOT administration at 0.01 and 0.1 mM concentrations failed to reverse the inhibition occurred by 2 mM melatonin application.

**Conclusion:** Agomelatin and melatonin have significant inhibitory effects on rat bladder smooth muscle contractions in vitro. These effects are dose-dependent. However, 4P-PDOT does not have a significant effect on rat bladder smooth muscle contractions. These results show that the inhibition of melatonin on bladder contraction is not mediated by melatonin 2 receptor.

**Keywords:** Agomelatin; Bladder; Melatonin; Rat; 4P-PDOT.



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İzole mesane dokusu, çok sayıda kimyasal ajanların fizyolojik ve farmakolojik açıdan etkilerinin araştırılıp ortaya konulmasının yanısıra uzun yıllardır klinik olarak tedavi amacıyla kullanılmasına imkan sağlayan bir dokudur. Günümüzde de izole mesane dokusunun fizyolojisinin daha iyi bir şekilde anlaşılıp ortaya konması için çeşitli çalışmalar yürütülmektedir.

İskelet kası ile kalp kası hızlı kasılmak üzere tasarlanmışken düz kas vücudun tüm bölümlerinde yer almıştır. Farklı görevler için yüksek seviyede adaptasyon sağlayan düz kas otonomik innervasyon ile kontrol edilir. İskelet ve kalp kasında bulunan aktin ve miyozin filamentleri düz kaslarda çizgili bantlar şeklinde bulunmaz (Guyton 2006).

Düz kaslar mesane, kan damarları, mide, barsaklar, uterus, solunum yolları gibi içi boş organların yanısıra göz, böbrek ve deride bulunur. Düz kaslar birçok yönden sınıflandırılabilir. Fazik düz kas uyarıldığında geçici olarak kasılır ve ara bağlantılar yoluyla tüm dokuya aksiyon potansiyeli aktarılır. Fazik kas bu özelliğinden dolayı tek birimli (üniter) düz kas olarak da adlandırılmıştır. Safra kanalları, kan damarları, barsaklar, mesane, mide, solunum yolları ve uterus gibi içi boş organların kasları buna örnektir. Çok üniteli (multiunit)kas olarak da adlandırılabilen tonik kas ise sürekli kas tonusunu sürdürebilir ve tek bir kas veya kas grubu çevredekilerden bağımsız işlev görür. Bu özelliklerle hareketler üzerinde ince kontrol sağlanabilmektedir. Gözde (pupil çapını kontrol eder), böbrekte (mezengiyal hücrelerle kan akımını düzenler), deride (piloerektör kaslar ile kılların dikleşmesi) bulunur. Bazı düz kas çeşitleri de birden fazla uyarıya cevap verecek fazik ve tonik özelliklerin karışımı şeklindedir (Wray 1993; Fomin ve ark 1999; Ganong 2011; Guyton 2006).

Düz kas filamentleri dinlenme durumunda iskelet kasında olduğu gibi standart bir boya sahip değildir. Kasılma esnasında bile ayrılıp birleşebilir. Uterus, mesane ve mide barsak kanalı gibi boş organların hücre iskelet yapısı ve düz kas sarkomerlerinin plastisitesilümen hacmindeki değişiklikler esnasında kasılmayı sürdürmek için gereklidir. Düz kas yapısı ve işlevlerine dair birçok detay halen aydınlatılmamıştır. Fakat düz kasında diğer kaslar gibi esas görevi benzer kasılma prensiplerini kullanarak kuvvet oluşturmaktır (Ganong 2011; Vander ve ark. 2010).

Mevcut çalışmanın amacı, in vitro mesane kasılmaları üzerine melatonin reseptörlerinin olası etkilerinin araştırılması ve bu etkilerin meydana gelmesinde reseptör agonist ve antagonistinin etki mekanizmalarının araştırılmasıdır. Yapılan bu çalışmanın sonunda elde edilecek bulgularla mesane ve mesane fonksiyonları ile ilgili terapötik kullanım alanlarına yönelik araştırmalara katkısağlanabileceği düşünülmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Düz Kaslar Ve Düz Kaslarda Kasılma

İnsan vücudunun yaklaşık %40'ı iskelet kasından, %10'u düz kas ve kalp kasından oluşur (Brooks 2003; Guyton 2006). Düz kaslardaiskelet kası ve kalp kasında olduğu gibi mikroskobik çizgilenmeler bulunmamaktadır (Fung 1993; Horowitz 1996; Hille 2001; Ganong 2011). Düz kas hücreleri tek çekirdekli ve iskelet kaslarına kıyasla çok küçüktür.Boyları20-500 µm, çapları ise 1–5 µm'dir (Horowitz 1996; Guyton 2006). Düz kaslardaki sarkoplazmik retikulumda (SR) iki tip  $Ca^{+2}$  kanalı vardır. Bunlar  $Ca^{+2}$  aktive  $Ca^{+2}$  kanalı olan ryanodin reseptörü (RyR) ile inozitol 1, 4, 5-trifosfat ( $IP_3$ )-kapılı  $Ca^{+2}$  kanallarıdır. RyR hücre içi  $Ca^{+2}$ 'nin artışıyla aktive olur.  $IP_3$  kapılı  $Ca^{+2}$  kanalı ise, bazı hormonal faktörlerin etkisine bağlı ortaya çıkan  $IP_3$  tarafından aktive edilir (Motta 1990; Chen ve ark. 1995; Berne ve Levy 2017). Düz kas hücrelerinde iskelet kasında olan T tübüleri bulunmaz. T tübüllerinin yerine düz kasta bulunan 'kaveol' olarak adlandırılan cepler SR'ye elektriksel bağlantı sağlar. Kaveollar hücrelerin yüzey/hacim oranını artırmaktadır (Somylo ve ark. 1994; Owens 1995;Berne ve Levy 2017).

Düz kaslarda  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu ekstraselüler ortamda  $10^{-3}$  M iken intraselüler ortamda  $10^{-7}$  M'dır (Guyton 2006). Bu durum hem intraselüler ile ekstraselüler arasında, hem de SR ile sitoplazma arasında çok yüksek bir  $Ca^{+2}$  gradiyenti oluşturur. Oluşan bu gradiyent farkı,  $Ca^{+2}$ 'nin hücre zarı ile SR zarından geçişi için net bir kuvvet oluştur. Böylece  $Ca^{+2}$ 'nin protein yapılı kanallar aracılığıyla geçişine yol açar. Bu protein yapılı kanallar, genellikle kapalıdır.Voltaj, mekanik uyarı veya ligand bağlanması ile aktive olarak  $Ca^{+2}$  geçirgenliğini sağlarlar (Alberts ve ark.2002). Sarkolemma, düz kas kasılmasında önemli rolü olan  $Ca^{+2}$ 'nin ekstraselüler sıvıdan giriş çıkışını düzenler. Bu yüzden sitoplazmik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu sadece SR ile değil, aynı zamanda sarkolemmal aktivite ile de düzenlenir (Chen ve ark. 1995; Huizinga 1992).

Hücresinin uyarılmasıyla SR'deki  $Ca^{+2}$  kanalları açılır, sitoplazmik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu hızla artar. İkinci haberci olan  $IP_3$ 'ün SR'deki reseptörlerine bağlanmasıyla salıverilme gerçekleşir.  $IP_3$ , agonistlerin ilgili reseptöre bağlanması sonucunda G proteini aracılığıyla aktive olan fosfolipaz C (PLC) enzimi tarafından meydana getirilir. PLC fosfatidilinozitol bifosfatı ( $PIP_2$ ),  $IP_3$  ve diaçilgliserole

(DAG) hidrolize eder. Oluşan  $IP_3$ , SR'ye diffüze olup  $IP_3$ -kapılı  $Ca^{+2}$  kanallarını açar. Bunun üzerine  $Ca^{+2}$  SR'den sitoplazma içerisine hızla salıverilir (Berridge 1993, Raeymaekers ve ark. 1993; Chen ve ark. 1995; Karaki 1997; Putney 2001).

SR'de ayrıca RyR kanalı bulunmaktadır. RyR'lerin aktivasyonu voltaj bağımlı  $Ca^{+2}$  kanallarından (VBCC) intraselüler ortama giren  $Ca^{+2}$  ile gerçekleşir. Sitoplazmik  $Ca^{+2}$ 'nin lokalize yükselmesi sonucunda kısa süreli RyR açılmaları meydana gelir. Bu spontan, lokalize sitoplazmik  $Ca^{+2}$  konsantrasyon artmaları, "Ca<sup>+2</sup> kıvılcımları" olarak isimlendirilen kısa parlak flaşlar oluştururlar (Nelson 1995; Jaggar ve ark. 2000).

$Ca^{+2}$ 'nin hücre içinden uzaklaştırılması üç farklı yolla meydana gelir:

1. SR membranındaki  $Ca^{+2}$ -ATPaz (SERCA) pompalarıyla SR'ye  $Ca^{+2}$  alımının artması.
2. Hücre membranındaki  $Ca^{+2}$  -ATPaz (PMCA) aracılığıyla  $Ca^{+2}$ 'nin hücre dışına atılması (Burdyga ve ark. 1994).
3. Diğer ikisine kıyasla daha az oranda  $Na^+$ - $Ca^{+2}$  değiştirici yardımıyla olmaktadır (Burdyga ve ark. 1994).

SERCA pompaları, SR lümeni ile sitoplazma arasındaki yaklaşık 10.000 katlık bir  $Ca^{+2}$  gradiyentini oluşturmak için gereken enerjiyi ATP hidrolizinden elde eder.  $Ca^{+2}$  SR içine pompalandıktan hemen sonra kalretikülin ve kalsekstrin gibi proteinler tarafından tamponlanır. Bu proteinlere büyük miktarda  $Ca^{+2}$  bağlanmaktadır (Sanders ve ark. 2000).

Kasılmanın başlamasında en önemli rolü iskelet kası ile kalp kasında olduğu gibi  $Ca^{+2}$  üstlenir. Düz kasın kasılması intraselüler  $Ca^{+2}$ 'nin artışıyla meydana gelir. İskelet kasındaki SR, kasılma için gerekli olan  $Ca^{+2}$ 'nin kaynağıyken, düz kaslarda  $Ca^{+2}$  iyonlarının hemen hemen hepsi aksiyon potansiyeli yada diğer uyarılar sonucunda hücre dışı sıvıdan kas hücresine girer (Kuriyama ve ark. 1998; Lee ve ark. 2002; Guyton 2006). Bu geçiş öncelikli olarak voltaj bağımlı  $Ca^{+2}$  kanalları aracılığıyla gerçekleşir. VBCC aktivitesi depolarizasyon derecesine bağlıdır. Daha büyük bir depolarizasyon gerçekleşmesi sonucunda hücreye daha fazla  $Ca^{+2}$  girer. Böylece daha güçlü bir kasılma ortaya çıkar (Fox 2016). İntraselüler  $Ca^{+2}$  artışı,

miyozin düzenleyici hafif zinciri (MHZ) fosforile ederek aktinle etkileşmesine yol açar. Böylelikle kuvvet oluşumuna yol açan bir  $Ca^{+2}$ -CaM bağımlı olan protein kinaz aktive olur. CaM'a dört  $Ca^{+2}$  molekülü bağlanmaktadır.  $Ca^{+2}$ -CaM kompleksi MHZ'yi fosforile eden miyozin hafif zincir kinazı (MHZK) aktive eder. Miyozin çapraz köprülerin fosforilasyonu sonucu miyozin başları aktine bağlanır.Çapraz köprü böylece ince filamanı kalın filamanın merkezine çeker ve dişli çark etkisi oluşturur. Böylece kuvvet meydana gelir. Bu esnada miyozin başından adenozin difosfat ile  $P_i$  serbestleşerek ATP'nin bağlanmasına izin verir. ATP, miyozinin aktine affinitesini azaltıp miyozinin aktinden ayrılmasını sağlar. Yeni bağlanan ATP'nin enerjisi, başı siklusa yeniden hazır hale getirmek için kullanılır. Bu şekilde çapraz köprü bir sonraki kasılma siklusuna hazır hale gelmiş olur. Çapraz köprü siklusları miyozin çapraz köprüsü fosforile kaldığı süreç boyunca devam eder. Çapraz köprü siklusları sitoplazmik  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu azalmaya başlayınca kadar her siklus için bir ATP'nin hidrolize olmasıyla devam eder (Huizinga 1992; Missiaen 1992; Berridge 1993; Murphy 1994; Nelson 1995; Lincoln ve ark. 1997; Miriel 1999).  $Ca^{+2}$  konsantrasyonundaki azalma sonucunda MHZK inaktif duruma geçer. Çapraz köprüler, miyozin hafif zincir fosfataz (MHZP) enzimi tarafından defosforile edildiği için kasılma durur (Berne ve Levy 2017).

### **2.1.1. Düz Kaslarda $Ca^{+2}$ 'un Rolü**

#### **2.1.1.1. Lokal $Ca^{+2}$ salınma olayları**

Büyük  $Ca^{+2}$  olaylarının yanı sıra çeşitli hücre içi  $Ca^{+2}$  sinyalleri ( $Ca^{+2}$  kıvılcımları ve pufar gibi) belirlenmiştir (Asada ve ark. 1999; Swillens ve ark. 1999; Gordienko ve Bolton 2002; Wier ve Morgan 2003; Heppner ve ark. 2005).  $Ca^{+2}$  kıvılcımları SR'dan RyR aracılığıyla salınan  $Ca^{+2}$ 'dan meydana gelir,  $Ca^{+2}$  pufarı da  $IP_3R$  açık olduğunda oluşur. Düz kastaki SR gelişmiştir ve 3D rekonstrüksiyonlar tüm hücrelere yayılan dantelsi bir ağ göstermektedir (Shmygol ve Wray 2004).

SR'daki  $Ca^{+2}$  salınım kanalları  $Ca^{+2}$  (RyR) ve  $IP_3R$  kapılıdır. Her iki reseptörde üç izoformdan meydana gelmektedir. Bu izoformların (özellikleri farklı olduğu için) differansiyal ekspresyonları aracılığıyla düz kas  $Ca^{+2}$  sinyalleşmesinde bazı çeşitliliklerin olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu farklılıklardan dolayı  $Ca^{+2}$  (hem RyR hem de  $IP_3R$ ) ve kafein (RyR) duyarlılığı üç izoform arasında farklılık arz eder. Bazı düz kas hücreleri (insan miyometriyumu (Morgan ve ark. 1996; Martin ve ark.

1999) ve birkaç kan damarı gibi) IP<sub>3</sub>R1-3 ve RyR1-3 ekspre ederken fare miyometriyumu yalnızca RyR3 izoformunu (Mironneau ve ark. 2002), rat üreteri IP<sub>3</sub> reseptörlerini ve kobay üreteri (Burdyga ve ark. 1997) sadece RyRlerini ekspre etmektedir.

### 2.1.1.2. Ca<sup>+2</sup> kısılcımları ve pufklar

RyR açıklığından küçük lokal Ca<sup>+2</sup> salınımları ilk olarak kardiyak miyositlerde belirlenmiştir ve Ca<sup>+2</sup> kısılcımları olarak adlandırılmıştır (Cheng ve ark. 1993). Ca<sup>+2</sup> kısılcımlarının varlığını ilk kez Nelson ve ark. (1995) arteryal miyositleri kullanarak düz kasta göstermişlerdir, ardından Miriel ve ark. (1999) hasarlı olmayan damarda Ca<sup>+2</sup> kısılcımlarının varlığını rapor etmişlerdir. RyR3'ün ağırlıklı olarak düz kas ve beynin bazı kısımlarında ekspre edildiği rapor edilmiştir. Özellikle Lohn ve ark. (2001) RyR3 izoform KO (knock out) fare kullanılarak yaptıkları çalışmada arteryal miyositteki Ca<sup>+2</sup> kısılcım sıklığında artış olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışma RyR3'ün Ca<sup>+2</sup> kısılcımlarına inhibitör olduğunu ileri sürmektedir. Gebe olmayan fare miyometriyumunda RyR3 ekspre edilen tek izoform olmuştur ve spontan Ca<sup>+2</sup> kısılcımları gözlemlenmiştir (Mironneau ve ark. 2002). RyR1-3 ekspre edilen gebe rat miyometriyumunda kısılcımlar nadiren gözlenmiştir. Bu durum RyR'ün inhibitör rolü ile tutarlılık göstermektedir. RyR2'nin (ayrıca kardiyak RyR izoformu olarak adlandırılır) Ca<sup>+2</sup> kısılcımlarının oluşumu için önemli olduğu düşünülmektedir. RyR2 havayolu düz kası (Du ve ark. 2005), portal ven (Coussin ve ark. 2000) ve mesanede (Ji ve ark. 2004) Ca<sup>+2</sup> salınımı ve kısılcımları ile ilişkilendirilmektedir.

Altı farklı hücre tipini içeren bir çalışmada Ca<sup>+2</sup> pufklarının kinetikleri, amplitüdüleri ve uzaysal yayılımlarının oldukça benzer olduğu rapor edilmiştir (Tovey ve ark. 2001). 'blip' terimi tek bir IP<sub>3</sub>R açıklığında oluşan Ca<sup>+2</sup> salınımı için kullanılmıştır. Kısılcımlarda olduğu gibi, bir Ca<sup>+2</sup> puf üretmek için birkaç kümelenmiş IP<sub>3</sub>R'nin birlikte açılması gerekmektedir. Kısılcımların aksine Ca<sup>+2</sup> pufklarına uyarılmamış şartlar altında nadiren rastlanır. Düz kas hücrelerinde Ca<sup>+2</sup> pufkları sadece rat uterusunda (Boittin ve ark. 2000) ve fare kolonik miyositlerinde (Bayguinov ve ark. 2000) belirlenmiştir.

Hem IP<sub>3</sub>R hem de RyR'nün pH ve diğer modülatörlerle birlikte Ca<sup>+2</sup> duyarlılığı açısından birbirini etkileyebildikleri ileri sürülmektedir. Örneğin düz

kaslarda (White ve McGeown2003) vas deferens, pulmoner damar (Zhang ve ark. 2003), portal vende(Gordienko ve Bolton 2002) IP<sub>3</sub>Rleri modüle eden kıvılcımlar rapor edilmiştir. Benzer şekilde RyRlerinden Ca<sup>+2</sup> salınımının IP<sub>3</sub>'den indüklemiş Ca<sup>+2</sup> salınımını artırdığı bildirilmiştir (Boittin ve ark.1999; Bayguinov ve ark. 2000). Bu tür etkiler SR'dan paylaşılan Ca<sup>+2</sup> havuzu kavramına da uyacaktır. Düz kasta bulunan pufların azlığı göz önüne alındığı zaman IP<sub>3</sub>Rünün bir RyR kümesinde bulunabileceği ve RyRlerinin yanıtlarını artırmak için işlev görebileceği iddia edilmiştir (Janiak ve ark. 2001).

### 2.1.1.3. Büyük Ca<sup>+2</sup> sinyalleşmesi ve kasılma

Düz kas ve diğer hücrelerde lokal olayların Ca<sup>+2</sup> dalgaları üretmek için toplanabileceği, ortaya çıkan bir görüştür. Bu şekilde Ca<sup>+2</sup> ile aktive edilmiş Cl<sup>-</sup> kanalları ya da kontraksiyon gibi intraselüler hedefleri aktive eden Ca<sup>+2</sup> seviyeleri elde edilebilir. Vasküler miyositlerde üretilen (yayılm gösteren) Ca<sup>+2</sup> dalgalarının sık deşarj bölgelerinde başlatıldığı ve kasılmayla sonuçlandığını Gordienko ve ark. (2001) göstermişlerdir. İleumda Ca<sup>+2</sup> kıvılcımları, dalgaların başladığı alanda belirlenmiştir (Gordienko ve ark. 1998).

Düz kasdaki fazik kasılmaların temelini oluşturan sebebin Ca<sup>+2</sup> daki (transit Ca<sup>+2</sup>) büyük artış olduğu varsayılmıştır. Austin ve Wray (1995) (vasküler), Taggart ve ark. (1996) (uterus), Brudyga ve ark. (1995) (üreter) çeşitli düz kasların kasılma gücü ve Ca<sup>+2</sup> miktarlarında simultane ölçümler yapmışlardır ve kaydedeğer benzerlikler tespit etmişlerdir. L-tipi Ca<sup>+2</sup> kanalının açılması miyofilamentleri aktive eden Ca<sup>+2</sup>'un başlıca kaynağıdır, bundan dolayı IP<sub>3</sub>'le indüklenmiş Ca<sup>+2</sup> salınımı derin sitoplazma Ca<sup>+2</sup>'nın salınımı yoluyla katkıda bulunabilir. Ayrıca Ca<sup>+2</sup> duyarlılığı/duyarsızlığı olarak da bilinen, Ca<sup>+2</sup> ve kasılma gücü arasındaki ilişkide değiştirilebilecek bir durumdur. Ana modülatör yolaclardan biri miyozin hafif zincir fosfotazın aktivitesini değiştiren agonistlerdendir (Somlyo ve Somlyo2003; Wray ve ark. 2003;Gerthoffer2005). Son veriler Rho-kinaz yolağının agonistlerin yokluğunda aktive olabileceğini göstermişlerdir (Shabir ve ark. 2004; Ratz ve ark. 2005).

#### 2.1.1.4. Lokal Ca<sup>+2</sup> sinyalleri ve uyarılabilirlik

Düz kas miyosit plazma membranında Ca<sup>+2</sup>'a duyarlı K<sub>Ca</sub> ve Cl<sub>Ca</sub> olarak adlandırılan iki iyon kanalı vardır. Membranın K<sup>+</sup> iletkenliğini artırarak K kanallarının aktive olması hiperpolarizasyon ve eksitabilitenin azalmasıyla ilişkilendirilir. Cl<sup>-</sup> kanallarının açılması durumunda Cl<sup>-</sup> sitoplazmadan ayrılacak, böylece membran repolarize olacak ve eksitabilitenin artması beklenecektir.

Üç tip K<sub>Ca</sub>, iletkenlik büyüklükleri, farmakolojileri ve moleküler temellerine göre tanımlanmıştır. İletkenliklerine göre gruplandırıldıklarında büyük (BK), orta (IK), küçük (SK) kanallar olarak isimlendirilirler. Düz kasta BK kanalları ve onların Ca<sup>+2</sup> kıvılcımları ile aktivasyonu en ilgi çekici olay oldu. Bu durum spontan transit dışı akım (STOC) olarak bilinen Ca<sup>+2</sup> kıvılcımına elektrofizyolojik karşılıktır (Benhan ve Bolton 1986; Nelson ve ark. 1995). Bunlar depolarizasyon ile görülen dışı akımla karşılaştırıldığında küçük akımlardır ve SR Ca<sup>+2</sup> salgımlarken spontan meydana gelmektedir. STOClar ve kıvılcımlar arasındaki ilişkinin kanıtı büyük ölçüde farmakolojiye dayanmaktadır. Eğer thapsigarjin ya da siklopiazonik asit (CPA) gibi ajanlarla SERCA'yı inhibe ederek SR Ca<sup>+2</sup>'den boşalırca kıvılcımlar kaybolur, bu yüzden STOClar da kaybolur (Nelson ve ark. 1995; Sieck ve ark. 1997; Gordienko ve ark. 1998). Eğer BK kanalları seçici olarak 1mM Tetraethylammonium (TEA) ya da iberiotoxin bloke edilirse Ca<sup>+2</sup> kıvılcımları STOCları ortaya çıkaramaz.

Ca<sup>+2</sup> kıvılcımları ile BK kanalları ve STOCların ilişkisini açıklamadan önce düz kasta SR'den Ca<sup>+2</sup> salınımının kontraksiyonları artırdığı düşünülmüştür. Bunun nedeni yakın zamana kadar Ca<sup>+2</sup> sinyallerinin düz kasta eksitator olduğunun düşünülmesi, çizgili kasta da SR'dan salınan Ca<sup>+2</sup>'un kontraksiyon için önemli olduğunun kabul edilmesi olmuştur. Ca<sup>+2</sup> kıvılcımları ilk olarak kardiyak kasta belirlenmiştir. Ca<sup>+2</sup>- indüklenmiş Ca<sup>+2</sup> salınımı gibi (CICR) membran yüzeyi boyunca Ca<sup>+2</sup> girişini amplifiye eden RyR'lerinden salınan Ca<sup>+2</sup>'un rolü tespit edilmiştir. Düz kasların birçoğunda RyRleri vardı ve kıvılcımlar çoğunda saptanabildiği için araştırmaların geneli CICR'nün kasılmayı artırmak için harekete geçeceğini varsaymışlardır.



Miyometriyum deneylerinde Taggart ve Wray (1998) RyR aracılı  $Ca^{+2}$  salınım inhibisyonunu ya da CPA ile SR boşaltılmasının sıçanlarda kontraktıl aktiviteyi artırdığını göstermişlerdir. Gebelikte uterusun kontrolü için miyometriyumdaki BK kanallarının rolü büyük önem taşımaktadır.  $Ca^{+2}$  kıvılcımlarının varlığını vasküler, destrusor (Herrera ve ark. 2000) ve üreterik (Burdyga ve Wray1999) düz kaslarda kanıtlayan birçok araştırma mevcuttur.

Birçok sistemik vasküler düz kasta  $Ca^{+2}$  kıvılcımları BK kanallarını aktive edebilir. Özellikle Nelson ve ark. (1995) çalışması, izole hücreler ve rodent kanı in vitro preparasyonları yanı sıra insan fizyolojisi uygulamaları ilgi uyandıran plan oluşturmuştur (Nelson ve ark. 1995; Brenner ve ark. 2000; Amberg ve ark. 2003). Bu bir dizi çalışmada araştırmacılar  $Ca^{+2}$  kıvılcımlarının hiperpolarize membran ile ilişkisini göstermişlerdir ve lokal  $Ca^{+2}$  sinyallerinin kontraksiyona sebep olmadığı sonucuna varmışlardır. Çalışmada ayrıca BK kanallarının hiperpolarizasyonu ürettiğini ve fonksiyonel açıdan önemli olduklarını göstermişlerdir. Dolayısıyla, BK kanalları bloke olduğunda kan damarlarının in vitro preparasyonları gücünde bir artış gösterdi. Buna ilave olarak PKC (Proteinkinaz C) aracılı vazokonstriktörlerin kıvılcımları önlediği (Bonev ve ark. 1997) belirtilmiştir, cAMP aracılı aktive olan vazorelaktanlar ise vazodilatasyona neden olmak için  $Ca^{+2}$  kıvılcımlarını artırmaktadırlar (Porter ve ark. 1998).  $\beta_1$  alt ünitesi, BK kanallarına gözenek oluşturan  $\alpha$  alt ünitesi ile ilişkilidir (Cox ve Aldrich2000). Genetiği değiştirilmiş  $\beta_1$  alt birimine sahip olmayan fareler yüksek kan basıncına sahiptirler (Brenner ve ark. 2000; Pluger ve ark. 2000; Lohn ve ark. 2001).  $\beta_1$  alt biriminin olmaması, bu hayvanlarda kanalın  $Ca^{+2}$  'ye karşı duyarlılığın azalmasına yol açtığı için  $Ca^{+2}$  daha yüksek bir seviyeye yükselmiştir. Böylelikle BK kanalı aktivitesi öncesi kasılma uyarılmıştır. Dolayısıyla bu çalışmalar BK kanal aktivitesindeki bozulmalar ile insandaki hipertansiyon arasında bir bağlantıyı ileri sürmektedir. Bu bağlantı Fernandez-Fernandez ve ark. tarafından 2004'de  $\beta_1$  alt biriminde tek bir aa mutasyonunu ortaya çıkaran epidomiyolojik bir çalışma ile rapor edilmiştir. Fernandez-Fernandez ve ark. (2004) bu mutasyonun BK kanalının  $Ca^{+2}$ 'e duyarlılığında bir artışa neden olduğunu ve bunun hipertansiyon riskinde azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle şiddetli hipertansiyonda sadece %3'ün mutasyonu varken, normotansif popülasyonun %21'i bu mutasyona sahip olmuştur. Hipertansiyon için birçok genetik yatkınlık daha önce tanımlanmış olsa da,

insanlardaki primer hipertansiyon ile bağlantılı doğrudan bir mekanizmanın ilk gösterimi bu mekanizma olmuştur.

SK ise mide (Suzuki ve ark. 1993), mesane (Herrera ve ark. 2000), kolon (Kong ve ark. 2000; Mazzone ve Buxton2003), uterus (Mazzone ve Buxton2003) gibi bir dizi farklı düz kasta belirlenmiştir. SK1-4 olmak üzere dört farklı izoforma sahiptirler. İzoformların işlevsel önemi ve dağılımları (Kong ve ark. 2000; Chen ve ark. 2004) tanımlanmıştır, özellikle SK3'ün düz kastaki eksitabilite ve kontraksiyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.  $Ca^{+2}$  ile aktive olan SK kanallarının kaynağı L-tipi  $Ca^{+2}$  kanallarının aracılığıyla SR ve yüzey membran girişi olabilir. Böylece, kolonik miyositlerde  $IP_3$  ile indüklenen  $Ca^{+2}$  salınımının, bir inhibitör purinerjik mekanizmanın parçası olarak relaksasyon ve hiperpolarizasyonun temelini oluşturduğu ileri sürülmektedir (Kong ve ark. 2000).

#### **2.1.1.5. $Cl_{Ca}$ kanalları ve $Ca^{+2}$ sinyalleşmesi**

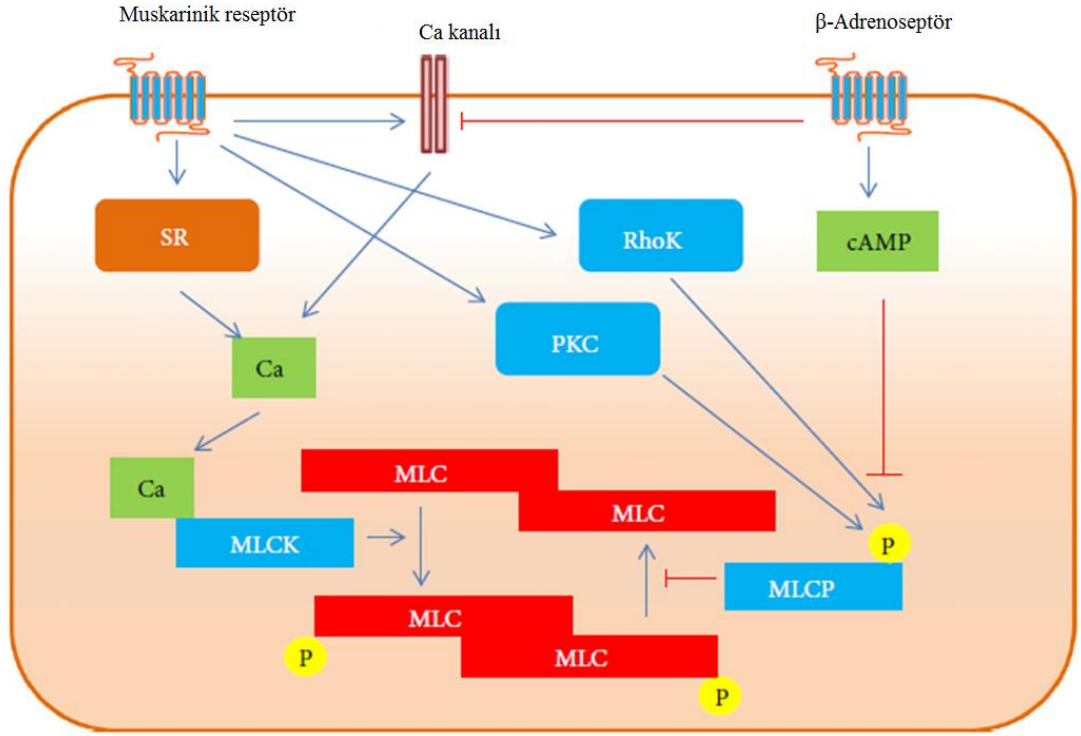
Düz kasların birçoğu bu kanalları ekspre eder ve  $Cl^-$  iletkenlikleri çizgili kasta daha yüksektir. Rat ureterik düz kas  $Cl_{Ca}$  hem  $Ca^{+2}$  dalgaları (Shabir ve ark. 2004) hem de aksiyon potansiyeli parametrelerinde etkiye yol açan (Burdyga ve Wray 2002) L-tipi  $Ca^{+2}$  kanalları aracılığıyla  $Ca^{+2}$  girişiyle aktive olabilir.  $Cl_{Ca}$  kanallarının aktivasyonu eksitabilitede artışa ve L-tipi  $Ca^{+2}$  kanallarının açılmasına yol açacaktır, bu yüzden pacemaker aktivitede rol aldığı iddia edilmektedir (Janssen ve Simms 1994). Uterus miyositlerinin sadece %30'u bu kanalları ekspre etmiştir, bu da uterus içindeki pacemaker alt hücre popülasyonunun bir özelliği olabileceğini ileri sürmektedir (Jones ve ark. 2004). Spontan aktivasyonun aksine, uterus ve diğer düz kas agonistlerinde  $Cl_{Ca}$  stimülasyonu için öncelikli yol olabilir. Bundan dolayı çeşitli düz kaslarda,  $IP_3$  ile indüklenen global  $Ca^{+2}$  artışı sonrası kontraksiyonlarda  $Cl^-$  kanallarının rolü görülmüştür (Janssen ve Sims1992; Criddle ve ark. 1996).  $Cl_{Ca}$  kanallarının aktivasyonu global  $Cl^-$  akımı yanı sıra STICs (spontan transient inward currents) olarak bilinen lokal transit içeri akımlar üretir (Janssen ve Simms 1994; Greenwood ve Large1996; Sergeant ve ark. 2001). Hem RyRler hem  $IP_3$ ler STICs aktivasyonunda belirlenmiştir (Craven ve ark. 2004).

## 2.2. Mesane Düz Kasında Kasılma Mekanizması

Düz kas tonusunu belirleyen nedir? Hücresel seviyede, detrusorda ve diğer dokulardaki düz kas kontraksiyonu, öncelikle serbest hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonundaki bir artış tarafından yönlendirilmektedir. Bununla birlikte, hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonuna yanıt olarak düz kas kasılmasının miktarı, çeşitli enzimlerin fosforilasyonu ile saptanmıştır (Ratz ve ark. 2005).

Sonuç olarak, düz kas tonusu, miyozin hafif zincirinin fosforilasyon durumuna bağlıdır (Şekil 2.1). Bu, bir enzim olan MHZK ile artırılır ve başka bir enzim MHZF ile azaltılır.  $Ca^{+2}$  CaM ile birlikte MHZK'nın aktivitesini artırarak MHZ fosforilasyonuna ve düz kas kasılmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte, MHZ'nin herhangi bir fosforilasyonu MHZF tarafından tersine çevrilebilir. MHZF'nin aktivitesi, Rho kinazı ve PKC'yi de kapsayan protein kinazların fosforilasyonu ile düzenlenmektedir. Ayrıca bu protein kinazlar, fosforile edildiğinde MHZF'nin ek inhibisyonuna neden olan CPI-17 olarak adlandırılan bir proteini de fosforile etmektedirler.

Kasılma kuvveti ile  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu arasındaki ilişki  $Ca^{+2}$  duyarlılığı olarak adlandırılmıştır. Muskarinik asetilkolin reseptörlerinde agonistler de dahil olmak üzere bazı kontraktıl ajanlar,  $Ca^{+2}$  duyarlılığını artırır ve dolayısıyla hücre içi  $Ca^{+2}$  yükselmesine bağlı olarak beklenenden daha büyük bir kasılma tepkisine neden olmuştur. Bu tür agonistlerin  $Ca^{+2}$ 'yi uyaran özelliklere sahip olduğu ileri sürülmüştür. Tersine,  $\beta$ -adrenoseptörlerinde agonistler de dahil olmak üzere bazı rahatlatıcı ajanlar,  $Ca^{+2}$  duyarlılığını düşürür ve dolayısıyla hücre içi  $Ca^{+2}$  üzerindeki etkilerine dayanarak beklenenden daha büyük bir gevşeme tepkisine neden olur. Bu gibi agonistlerin  $Ca^{+2}$  desensitizasyonuna neden olduğu iddia edilmiştir (Ratz ve ark. 2005).



**Şekil 2.1.** Detrusor düz kas kontraksiyonlarının muskarinik reseptör ve  $\beta$ -adenoreseptörler tarafından düzenlenmesi (Michel 2015).

Yakın zamanda yapılan iki araştırma  $Ca^{+2}$  sensitizasyon ve  $Ca^{+2}$  duyarsızlaştırma ile ilgili sinyal iletim süreçleri üzerine ilave ışık tutmuştur. Hayashi ve ark. (2015), izole edilmiş insandaki detrusor şeritlerini,  $\beta$ -adenoreseptörlere cevap olarak üretilen ikinci bir haberci olan cAMP ile bir muskarinik reseptör agonisti olan karbakol arasındaki etkileşimi incelemek için kullanmışlar ve cAMP'nin karbakol ile indüklenen  $Ca^{+2}$  sensitizasyonunu inhibe edebildiğini göstermişlerdir. PKC inhibe edildiğinde cAMP tarafından indüklenen gevşeme daha da artmışken PKC'ye eşlik eden Rho kinaz inhibisyonunun etkisinin oldukça küçük olduğu belirlenmiştir.

Başka bir çalışmada, Cernecka ve ark. (2015) doğrudan  $Ca^{+2}$  sensitizasyonu üzerinde çalışmamışlardır, ancak elde ettikleri veriler Hayashi ve ark. (2015)'nin datalarıyla eşleşmiştir. Cernecka ve ark. (2015) Rho kinazın inhibisyonunun insan detrusor şeritlerindeki iki  $\beta$ -adenoreseptör agonisti tarafından gevşemeyi arttırdığını bulmuşlardır. Buna karşın, sıçan detrusor şeritlerinde tutarlı bir artış gözlenmediği rapor edilmiştir. Bir kontraktıl ajan yokluğunda,  $\beta$ -adenoreseptör agonistleri MHZ fosforilasyonunu belirgin bir şekilde azalttığı rapor edilmiştir. Aksine, karbakolgeçici

olarak MHZ fosforilasyonunu arttırmıştır ve ilginç bir şekilde  $\beta$ -adrenoseptör agonistlerinin ek varlığı bu tepkinin inhibisyonuna neden olmamıştır.

Bütün bunlar ne anlama geliyor? İnsan detrusor düz kası hücrelerinin kasılması öncelikle endojen muskarinik agonist asetilkolin tarafından uyarılır. Bu durum muskarinik reseptör antagonistleri tarafından inhibe edilebilir, ancak özellikle patofizyolojik ortamlarda, ATP ve bradikinin gibi ek kontraktıl ajanlar da rol oynadığı için muskarinik reseptör antagonistleri sınırlı etkinliğe sahiptir.  $\beta$ -adrenoseptör agonistleri, bir muskarinik agonist tarafından başka bir uyarı (Michel ve Sand 2009) tarafından indüklenen kasılmaya karşı biraz daha az olsa da, her türlü kontraktıl uyarana karşı gevşemeye neden olabilir. Bu diferansiyel rahatlama, muskarinik agonistin neden olduğu  $Ca^{+2}$  sensitizasyonunu yansıtabilir.  $Ca^{+2}$  sensitizasyonuna ve duyarsızlaştırmaya neden olan mekanizmaların daha iyi anlaşılması, aşırı aktif ve/veya yetersiz detrusor için yeni tedavi yöntemleri sağlayabilmektedir.

### **2.2.1. Membran Eksitasyonu**

#### **2.2.1.1. Dinlenme potansiyeli ve aksiyon potansiyeli**

Detrusor kası hakkında elektrofizyolojik bilgiler, insanlar da dahil olmak üzere çeşitli türlerden elde edilmiştir. Kobay detrusor dokusunda -31 ile -53 mV arasında (Hashitani ve ark. 2000; Hashitani ve ark. 2001), tavşandaki ortalama değer -37 mV ve sıçanda -47 mV dinlenme membranı potansiyel değerleri bildirilmiştir. İzole insan detrusor hücrelerinde, 3M KCl dolu mikroelektrotlar tarafından kaydedilen zar potansiyeli -47 ve -55 mV arasındadır (Montgomery ve Fry 1992; Visser ve Mastrigt 2001).

Yavaş depolarizasyon dalgaları ile bağlantılı spontan aksiyon potansiyelleri, birkaç araştırmacı tarafından tavşan ve kobaydan alınan detrusor dokusunda gösterilmiştir (Hashitani ve ark. 2000; Hashitani ve ark. 2001). Benzer aksiyon potansiyeli, insan detrusor hücrelerinde de tanımlanmıştır (Montgomery ve Fry 1992; Visser ve Mastrigt 2001). Kobay detrusorünün spontan elektriksel aktivitesi genellikle düzenli aralıklarla meydana gelen tekli spayklardır, ancak zaman zaman sivri patlamalar olarak kaydedilebilmiştir (Hashitani ve ark. 2000; Hashitani ve ark. 2001).

İnsan detrusoründe, aksiyon potansiyelinin depolarizasyon fazı içe doğru  $Ca^{+2}$  akımı ile oluşmaktadır (Montgomery ve Fry 1992). Repolarizasyon ise muhtemelen  $Ca^{+2}$  akımının inaktivasyonunu ve kısmen  $Ca^{+2}$  bağımlı dışa  $K^{+}$  akımının aktivasyonunu içermektedir (Mostwin 1986; Montgomery ve Fry 1992).

Kobaymesanesinde yapılan çalışmada gösterildiği gibi, spontan aksiyon potansiyelleri  $[Ca^{+2}]_i$  daki artış ile ilişkilidir, spontan AP kafein, ryanodin veya CPA tarafından engellenmemiştir. Bu durum da  $[Ca^{+2}]_i$  depolarlarının onların varlığı ile bağlantılı olmadığını ileri sürmektedir (Hashitani ve ark. 2000). Bununla birlikte, intraselüler depolardan  $Ca^{+2}$  salınması, aksiyon potansiyelleri ile ilişkili  $[Ca^{+2}]_i$ 'deki artışı artırabilir.  $[Ca^{+2}]_i$ 'deki artışlar düz kas demetleri sınırı boyunca gerçekleştiikten sonra ara bağlantılar yoluyla diğer demetlere yayılmıştır (Hashitani ve ark. 2001).

### **2.2.1.2. $Ca^{+2}$ kanalları**

Hiç şüphe yok ki  $[Ca^{+2}]_i$  'deki bir artış, detrusorde kasılmanın etkinleştirilmesi için gerekli olan önemli bir işlemdir. Bununla birlikte, bu artışın ekstraselüler alandan gelen akımdan ve/veya intraselüler depolardan salınımdan kaynaklanıp kaynaklanmadığı hala tartışılmaktadır (Kajioka ve ark. 2002). Düz kasta birkaç çeşit  $Ca^{+2}$  kanalı gösterilmiştir, ancak detrusor için, voltajla çalışan kanallar hakkında daha fazla bilgi mevcuttur. Örneğin birçok düz kas tipinde  $Ca^{+2}$  geçirgenliklerinde belirgin derecede farklılık olan en az iki SOCs (depo işlevli  $Ca^{+2}$  kanalları) bulunmaktadır (Albert ve Large 2003). Ancak bu kanalların detrusor kontraksiyonları için önemini ortaya koyan çalışmalar henüz bulunmamıştır.

Ganitkevich ve Isenberg (1992) kobaydetrusor kasında  $[Ca^{+2}]_i$  akışını kaydettikleri çalışmada VBCC yoluyla  $Ca^{+2}$  taşımalarının depolarizasyon aracılı  $[Ca^{+2}]_i$  değişikliğinde kilit olaylar olduğunu rapor etmişlerdir. Bununla birlikte çalışmada L-tipi  $Ca^{+2}$  kanalları vasıtasıyla depolarizasyonla indüklenen  $Ca^{+2}$  akışının intraselüler depolardan  $Ca^{+2}$  salınmasını indüklediği sonucuna varmışlardır.

Muskarinik reseptör stimülasyonunun (karbakol), L-tipi  $Ca^{+2}$  akımını domuz ve insan detrusor hücrelerinde önleyebildiği gösterilmiştir (Kajioka ve ark. 2002; Yoshino ve Yabu 1995). Bunun iki bağımsız mekanizma vasıtasıyla ortaya çıktığı öne sürülmüştür: 1)  $Ca^{+2}$  kanalının  $Ca^{+2}$  aracılı inaktivasyonu 2) GTP-bağlayıcı protein aracılı mekanizma (Yoshino ve Yabu 1995).

Hayvansal detrusor dokusu üzerinde yapılan birçok çalışma, dihidropiridine duyarlı  $Ca^{+2}$  kanalları üzerinden ekstraselüler  $Ca^{+2}$  girişinin önemi ve ATP ve ACh gibi transmitterlerle detrusor aktivasyonu için intraselüler  $Ca^{+2}$ 'un mobilizasyonunu göstermiştir (Andersson 1993). Buna ek olarak muskarinik reseptör stimülasyonunun, kontraktıl mekanizmanın  $Ca^{+2}$  duyarlılığını arttırdığı öne sürülmüştür. İnsan detrusoründe (Fovaeus ve ark.1987), ekstraselüler  $Ca^{+2}$ 'un aktivasyon sürecinde önemli bir rol oynamakta olduğu görülmüştür. Birçok çalışma, muskarinik ve/veya purinerjik stimülasyon ile indüklenen kontraksiyonda ekstraselüler  $Ca^{+2}$  girişinin (bu giriş için dihidropiridin duyarlı  $Ca^{+2}$  kanalları daha yaygındır) önemini ortaya koymuştur.

Uchida ve ark. (1994), kobay detrusor striplerinde karkabol ile uyarılan tonik-kontraktıl yanıtın esasen hücre membran depolarizasyonuna bağlı olduğunu ve ekstraselüler  $Ca^{+2}$  akışı olduğunu iddia etmişlerdir. Bu depolarize cevabın ise PKC'nin muskarinik reseptör aktivasyonu yoluyla ATP'ye duyarlı K kanallarının inaktivasyonuna sebep olabileceğini öngörmüşlerdir. Wu ve ark. (2002), intraselüler  $Ca^{+2}$  depolarının yeniden doluşunun L-tipi  $Ca^{+2}$  kanallarının aracılık ettiği  $Ca^{+2}$  akımıyla gerçekleştiğini öne sürmüşlerdir. Bu  $Ca^{+2}$  akımı bir feedback mekanizması ile düzenlenir. Mekanizmada, L-tipi  $Ca^{+2}$  kanallarının iletiminde artış ve hücre depolarizasyonu meydana getirerek  $Ca^{+2}$  ile aktive olan K kanallarının aktivasyonu  $[Ca^{+2}]_i$  düşüşünü azaltmıştır.

### **2.2.1.3. K kanalları**

Birçok  $K^+$  kanalı arasında destrusor fonksiyon için önemli olanlar ATP'ye duyarlı ve  $Ca^{+2}$  ile aktive olmuş (büyük, orta ve küçük iletkenlik) kanallar olarak belirlenmiştir (Wickenden 2002). Detrusordeki diğer  $K^+$  kanallarının oluşumu ve işlevi hakkında bilgi yetersizdir.

#### **2.2.1.3.1. ATP'ye duyarlı $K^+$ kanalları**

Detrusor ATP'ye duyarlı  $K^+(K_{ATP})$  kanallarını ekspre eder ve bu kanallar mesane kontraktılitesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Andersson 1992). Spontan aksiyon potansiyellerinin frekansı voltaja duyarlıdır. Bu nedenle, detrusor kas hücre membranı hiperpolarizasyonu, aksiyon potansiyelinin ateşlenmesini ve buna bağlı kontraksiyonu azaltabilmektedir.  $K^+$  kanal açıcıları,  $K^+$ 'un sızmasına

müteakip  $K^+$  kanallarının açılmasıyla hiperpolarizasyonu üretmektedirler (Andersson 1992, Andersson 1993). Bu kanal, vasküler düz kasındaki  $K_{ATP}$ 'na benzemektedir.

$K_{ATP}$ 'nın rolünün anlaşılmasında kritik bir husus, kanal aktivasyonu ile doku fonksiyonu üzerindeki etki arasındaki ilişkidir. Petkov ve ark(2001)  $K_{ATP}$ 'nı, ZD-6169 ve levkromakalim ile aktive ederek kobay detrusor hücrelerindeki bu ilişkiyi araştırmışlardır. Sonuçlar,  $K_{ATP}$ 'nın %1'inin aktivasyonunun önemli ölçüde aksiyon potansiyellerini ve ilgili fazik kasılmaları inhibe etmek için yeterli olduğunu önermiştir.

#### **2.2.1.3.2. $Ca^{+2}$ ile aktive edilen $K^+$ kanalları**

Grine ve Zuzack (1991) kobay detrusor hücrelerinde, ( $BK_{Ca}$ ) kanallarının incelenmesi için prob olarak kullanılan charybdotoxin ile iberiotoxin'in belirgin uyarıcı etkilerini bulmuşlardır ve bu kanalların membran potansiyeli ve bazal tansiyon kontrolünde yer alabileceğini önermişlerdir.  $BK_{Ca}$  kanallarının membran potansiyelini kontrol etmede ve detrusor düz kasının kontraktilesinde önemli rol oynamaları diğer araştırmacılar tarafından da doğrulanmıştır (Karicheti ve Christ 2001).

Intraselüler  $Ca^{+2}$  ve  $BK_{Ca}$  akımlarının ölçülmesi,  $BK_{Ca}$  akımlarının SR'deki RyRlerinden  $Ca^{+2}$  salınım olayı ( $Ca^{+2}$  kıvılcımı) ile aktive olduğunu açığa çıkarmıştır (Herrera ve ark. 2001). Bu reseptörler insan detrusoründe gösterilmiştir. Herrera ve ark. (2001)  $Ca^{+2}$  kıvılcımları ile  $BK_{Ca}$  akımlarını karakterize etmişlerdir ve kobaydetrusor düz kasında RyRlerinin  $BK_{Ca}$  kanallarına bağlanmasının voltaj bağımlılığı olduğunu belirlemişlerdir.

Sadece  $BK_{Ca}$  kanalları değil aynı zamanda  $SK_{Ca}$  da detrusor düz kasında eksitabilite düzenleyicileridir. Herrera ve Nelson (2002),  $SK_{Ca}$  kanal blokerı apamini kullanarak, kobaydetrusoründe bulunan  $SK_{Ca}$  kanallarının rolünü incelemişlerdir. Ve bu çalışma ile Apaminin, geniş bir konsantrasyon aralığında ( $10^{-10}$  ile  $10^{-6}$  M) fazik kasılmaların genliklerinde konsantrasyona bağlı bir artışa neden olduğunu bulmuşlardır. Herrera ve Nelson (2002) VBCC ve RyRlerinden  $SK_{Ca}$  ve  $BK_{Ca}$  kanallarına  $Ca^{+2}$  sinyallerinin etkisini belirlemek için, tüm hücre zarı akımını ölçmüşlerdir. Sonuçlar VBCC ile  $Ca^{+2}$  girişinin  $BK_{Ca}$  ve  $SK_{Ca}$  kanallarını aktive



ederken, RyRleri vasıtasıyla  $Ca^{+2}$  salınımının ( $Ca^{+2}$  kısılcımları) yalnızca  $BK_{Ca}$  kanallarını aktive ettiğini öngörmüşlerdir.

#### **2.2.1.3.3. Voltaj kapılı $K^+$ kanalları**

Fare detrusor miyositlerinde, Thorneloe ve Nelson (2003) voltaj kapılı  $K^+$  akımının biyofiziksel, farmakolojik ve moleküler özelliklerini tespit etmişlerdir. Davies ve ark. (2002)  $K_V$ 'nin insan detrusor düz kasında ekspre edilip, işlev gördüğünü iddia etmişlerdir.  $Ca^{+2}$ 'a bağlı olmayan  $K^+$  akımı bir  $K_V$  blokeri olan 3,4-diaminopiridin tarafından engellendi.  $K_V$  akım blokerlerinde spontan kasılmaların genliğini artırmakla karakterize edilen miyojenik bir etki olduğu düşünülmektedir. Davies ve ark. (2002)  $K_V$  alt birimlerinin detrusor kasında eksprese edildiği ve işlevsel olarak önemli olduğu sonucuna varmışlardır.

#### **2.2.1.4. Gerim aktiveli kanallar**

Detrusor kas hücrelerinde hücre membranı mekanik gerilmesinin, spesifik olmayan katyon kanallarını aktive ettiği önerilmiştir. Kanallar, gadolinyum iyonu ( $Gd^{+3}$ ) ve grammostola spatulata zehiri tarafından engellenebilmektedir. Eğer bir hücre dinlenme uzunluğunun % 20'sine kadar gerilirse, total akım L-tipi kanalları açmaya ve  $Ca^{+2}$  akışını artırmaya yetecek şekilde hücreyi depolarize edebileceği ileri sürülmüştür. Gerim aktiviteli kanalların mesane duvarında uzunluk detektörleri gibi davranma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Fry ve ark. 1998).

Hiposmotik yolla indüklenen hücre şişmesi, çeşitli hücre modellerinde gerim aktiveli kanalları uyarmak için yaygın olarak kullanılmıştır. Chambers ve ark. (1997), izole edilmiş insan detrusor düz kas hücrelerinin hiposmotik solüsyonlarla membran gerilmesine karşı duyarlı olduğunu ve içerdiği mekanizmaların intraselüler  $Ca^{+2}$ 'un doğrudan mobilizasyonunu içerdiğini göstermişlerdir. Ayrıca, kararlı ve kararsız (aşırı aktif) mesanelerden izole edilen hücrelerin yanıt verme oranlarının farklı olabileceğini önermişlerdir. Benzer bir model kullanarak, Tertyshnikova ve ark. (2003) gadolinyum ve grammostola spatulata zehirinin insan detrusor miyositlerinde gerimle indüklenen  $Ca^{+2}$  sinyalleşmesini inhibe ettiğini iddia etmişlerdir. Zehir sıçan mesanesinin in vitro modelinde, mesane uyumluluğunu geliştirmiş ve spontan mesane kasılmalarının sıklığını önlemişlerdir. Çalışmanın sonuçlarına göre, detrusor hücrelerinde gerimle indüklenen sinyalizasyonun

etkinleştirilmesinin, mesane dolumu sırasında detrusor kontraktilesinin miyojenik düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini ve gerimle aktiveli kanalların inhibisyonunun mesane uyumluluğunu iyileştirebileceğini önermişlerdir.

### **2.2.1.5. Ligand aktiviteli kanallar**

Ligand kapılı iyon kanalları bazı hücrelerde oluşur ve bir dizi transmitter/modülatör kullanmaktadır. P2X reseptörlerinin aktivasyonu, katyonlara nispeten nonselektif bir kanal açmaktadır. Bu durum çoğunlukla Na<sup>+</sup> tarafından taşınan içe doğru bir akım üretmiştir ve depolarizasyona sebep olmuştur (Inoue ve Brading 1991).

Evans ve ark. (1996), P2X<sub>1</sub> ve P2X<sub>2</sub> reseptörlerini eksprese eden hücrelerdeki tam hücre yama kenetini kullanarak ATP tarafından uyarılmış zar akımlarını kaydetmişlerdir. İki reseptör arasında, monovalent organik katyonlara geçirgenlikleri açısından fark bulunmamıştır. P2X<sub>1</sub> reseptörlerinin Ca<sup>+2</sup> geçirgenliği P2X<sub>2</sub> reseptörlerinden daha fazladır. P2X<sub>2</sub> reseptörünü eksprese eden hücrelerde ATP ile uyarılan akımlar, artırılan ekstraselüler Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonu ile inhibe edilmiştir. Buna karşın P2X<sub>1</sub> reseptörünü eksprese eden hücrelerde ATP ile uyarılan akımlar, ekstraselüler Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonundaki bu tarz artışlarla inhibe edilmemiştir.

## **2.3. Melatonin**

### **2.3.1. Melatonin Biyosentezi**

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) Lerner ve ark. (1958) tarafından ilk olarak izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Güçlü bir serbest radikal temizleyici ve birçok bitkide redoks-aktif enzimlerin regülatörüdür (Poeggeler ve ark. 1993), memeli sirkadiyen ritminde regülatör rolleri olan önemli bir hormondur (Kennaway ve Wright 2002). Omurgalı pineal bezi tarafından günün karanlık evresinde sentezlenen ve salgılanan bir nörohormondur. Günün aydınlık evresinde mavi ışık, melanopsin içeren (suprakiazmatik çekirdeğe impulslar gönderen) retina ganglion hücrelerini uyarır. Bu impulslar pineal beze gelen sempatik uyarıyı engellediği için melatoninin salınmasını bastırır (Wurtman ve ark. 1964; Geoffriaue ark. 1999). Pineal bezdeki melatoninin sentezi birkaç adım içerir. Öncelikle, serebral damarlardan alınan L-triptofan, serotonin haline dönüştürülür. Serotonin daha sonra hız sınırlayıcı

arilalkilamin N-asetiltransferaz (AANAT) ile N-asetil-5-hidroksitriptamin'e (N-asetilserotonin) metabolize olur. Sentez işleminin son basamağı, N-asetil-5-HT'nin hidroksindol-o-metil transferaz (HIOMT) ile melatonine dönüştürülmesidir.

Melatonin, insan vücudu boyunca yaygın olarak bulunan bir lipofilik hormondur (Axelrod ve Wurtman 1968;Reiter 1991; Claustrat ve ark. 2005). Bir kez oluştuktan sonra, melatonin yüksek konsantrasyonlarda beyin-omurilik sıvısına ve kılcıl damarlara salınır, daha sonra çoğu vücut dokusuna hızla dağıtılır (Cardinali ve Pevet 1998;Tricoire ve ark. 2003). Vücudun organ ve dokularının çoğu, pineal bezinki ile benzer bir metabolik yol aracılığıyla melatonini sentezlemektedir (Stefulj ve ark. 2001). Melatoninin bu ekstra-pineal kaynakları dokunun yerinde korunması için kritik sayılmaktadır (Kvetnoy 2002). Melatoninin doğrudan ya da aracı etkileri gösteren in vivo veya in vitro çalışmalar sırasında farklı etkiler meydana getirdiği gösterilmiştir. Bu bağlamda, melatoninin sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesinde yer aldığı ve kortizol, gonadotropinler ve büyüme hormonu gibi diğer hormonların seviyesini kontrol eden mevsimsel tepkilere katıldığı iyi bilinmektedir.

Tüm bu etkilere ve daha fazlasına sebep olduğu bilinen melatonin ile ilgili 1970 Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü sahibi Julius Axelrod tarafından çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bununla birlikte 'DNA onarımı ile ilgili mekanik çalışmaları' üzerine Biyokimya Nobel Ödülü (2015) sahibi olan Aziz Sancar ve ark. çalışmada melatonin üzerine odaklanmışlardır.

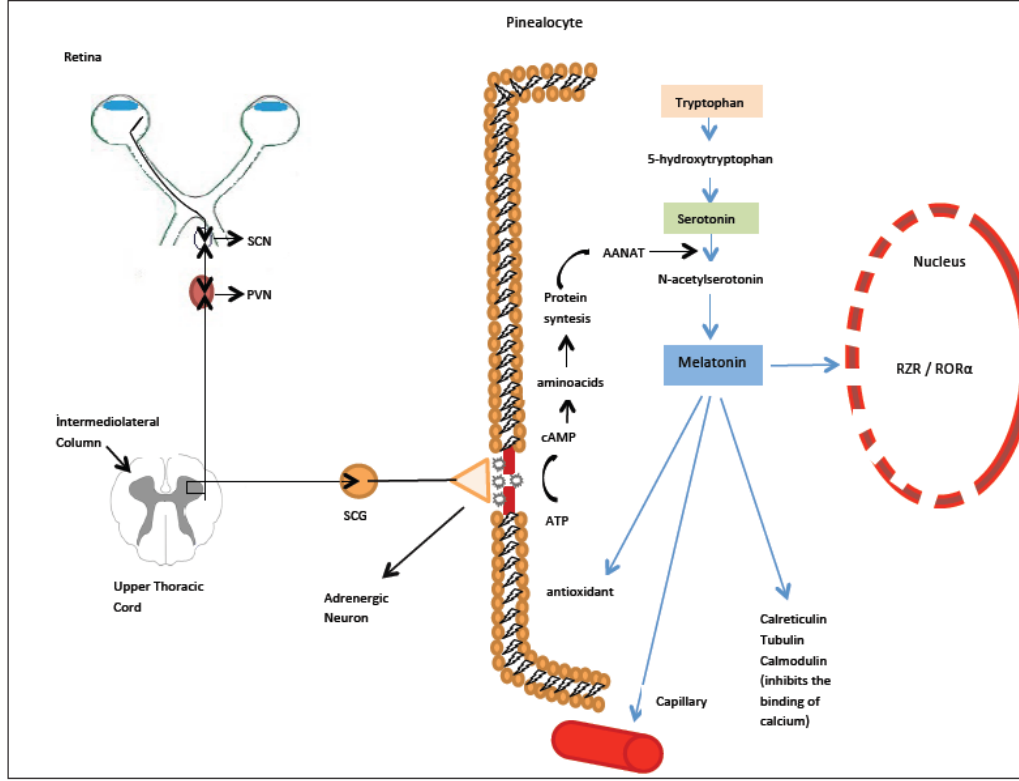
Dolaşımdaki melatonin, başta karaciğerde metabolize olur. Sitokrom P450 monooksijenazlar tarafından hidroksillenmiş ve daha sonra 6-sülfatoksimeletonini oluşturmak üzere sülfat ile konjuge edilmiştir (Skene ve ark. 2001). Melatonin ayrıca oksidatif pirol-halkası bölünmesi ile kinuramin türevlerine metabolize olmaktadır (Hirata ve ark. 1974).

### **2.3.1.1. Melatonin etki mekanizması**

Memelilerde melatoninin başlıca etki mekanizmaları 4 madde halinde özetlenebilmektedir (Macchi ve Bruce 2004). Bunlar;

- kalmodulin gibi hücre içi proteinlere bağlanma,
- antioksidatif etkiler,

- orphan ailesinin nükleer reseptörlerine bağlanma,
- plazma membranında bulunan melatonin reseptörlerine bağlanma şeklindedir.



**Şekil 2.2.** Gözden pineal beze nörolojik yolak. Adrenerjik uyarıdan sonra melatoninin pinealositde intraselüler sentezi ve etkisi (Emet ve ark. 2016)

Yapılan birçok çalışma melatoninin, ikinci habercilerin sinyal iletiminde yer alan hücre içi bir protein olan CaM ile doğrudan etkileşime girebileceğini ve melatoninin,  $Ca^{+2}$ 'un CaM'e bağlanmasını doğrudan antagonize ettiğini göstermektedir (Benitez-King ve Anton-Tay 1993; Pandi-Perumal ve ark. 2008). Melatonin CaM, kalretikülin ve tubulin isimli hücre içi proteinlerle etkileşmektedir (Ekmekcioglu 2006; Pandi-Perumal ve ark. 2008 (Şekil 2.2)). Düz kas biyolojisinde potansiyel önemi melatoninin CaM (Benitez-King ve Anton-Tay 1993) ve kalretikulin (Macias ve ark. 2003) ile olan etkileşimidir, çünkü bu proteinler düz kası kasılmasında ana faktör olan  $Ca^{+2}$  sinyalleşmesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bunun yanısıra melatoninin CaM'e  $Ca^{+2}$  bağlanması üzerindeki inhibe

edici etkisinin (Benitez-King 2006) çeşitli düz kas tiplerinde melatoninin gevşetici etkilerinin temelini oluşturup oluşturmadığı hala tam olarak bilinmemektedir. Melatoninin  $Ca^{+2}$ -CaM'e bağlanması,  $Ca^{+2}$ -CaM bağımlı nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) aktivasyonunu da engeller (Leon ve ark. 2000). Sitoplazmik proteinler ve melatonin arasındaki etkileşime başka bir örnek, göğüs kanseri hücre çoğalması üzerine melatoninin muhtemel antiproliferatif etkilerinin kısmen bu etki aracılığıyla ilişkili olabileceğinin düşünülmesidir (Sanchez-Barcelo ve ark. 2005).

Melatoninin antioksidatif ve faydalı etkileri, iskemi/reperfüzyon, iltihaplanma, iyonize radyasyon, mitokondriyal toksinler vb. gibi serbest radikaller ve ilgili reaktanlarla ilişkili çeşitli patolojik koşullarda kapsamlı bir şekilde sunulmuştur (Allegra ve ark. 2003; Tan ve ark. 2003; Reiter ve ark. 2004, Rodriguez ve ark. 2004).

Retinoid bağlantılı Orphan çekirdek hormon reseptör ailesi (RZR/ROR) melatoninin immünomodülatör etkilerinden sorumludur. IL-2 ve IL-6, bu mekanizma ile tek çekirdekli hücrelerde üretilmektedir (Garcia-Maurino ve ark. 1998; Carrillo-Vico ve ark. 2005; Ekmekcioglu 2006 (Şekil 2.2)). Melatoninin lipofilik özelliği hücre içi proteinlerle etkileşime girmesine izin verir. Bu nükleer faktörlerin aktivasyonu özellikle de bağışıklık düzenleyici genlerin ekspresyonunu veya bastırılmasını indüklemektedir (Steinhilber ve ark. 1995). Melatonin RZR/ROR için doğal bir ligand gibi iş görmektedir. RZR/ROR $\alpha$ , çeşitli organlarda eksprese edilirken, RZR $\beta$  beyin ve retina için spesifiktir (Smirnov 2001). RZR/ROR ailesinin üçüncü üyesi olan ROR $\gamma$ , iskelet kası cDNA'sında eksprese edilir (Hirose ve ark. 1994).

Melatonin aynı zamanda retinal fizyoloji, mevsimlik üreme döngüsü, kanser gelişimi ve büyümesi, bağışıklık modülasyonu, antioksidasyon ve serbest radikal temizleme, mitokondriyal solunum, kardiyovasküler fonksiyon, kemik metabolizması ve gastrointestinal fizyoloji gibi fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerin büyük bir çoğunluğunu düzenler (Arendt 2006; Ekmekcioglu 2006; Pandi-Perumal ve ark. 2006). Bu nedenle, melatoninin çeşitli kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmek (Ram ve ark. 2002) ve immünomodülatör özellikleri ortaya çıkarmak gibi çeşitli klinik uygulamaları olduğu öne sürülmüştür (Carrillo-Vico ve ark. 2006). Güçlü bir antioksidan ve serbest radikal süpürücü olan melatonin, serbest radikal ve nörotoksin kaynaklı hasardan etkilenen nöronal hücrelere nöron koruyucu ve anti-inflamatuar

etkiler sunmaktadır. Bu etkilerin aracılığıyla Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, inme gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde potansiyel terapötik faydalar göstermiştir (Bondy ve Sharman 2007; Reiter ve ark. 2007).

Melatonin pineal bezden geceleri salınan bir hormon olmakla birlikte uyku-uyanıklık döngüsü, pubertal gelişim ve mevsimsel adaptasyonun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Melatoninin vücut duruşu, denge kontrolü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Pandi-Perumal ve ark. 2008). Melatonin doğrudan hipokampal nöronları etkileyen bellek oluşumunu düzenlemektedir (Comai ve Gobbi 2014). Melatonin antinosiseptif, antidepresan, anksiyolitik, antineofobic ve lokomotor aktivite düzenleyen etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır (Uz ve ark. 2005). Ayrıca yapılan araştırmalara göre melatonin nöroprotektif, anti-inflamatuar, ağrı düzenleyici, kan basıncı düşürücü, retinal, vasküler, mevsimsel üreme, osteoblast farklılaşması, anti-tümör ve antioksidan etkilere yol açmıştır (Li ve ark. 2013; Comai ve Gobbi 2014).

Melatonin intravenöz uygulaması periferik kan dolaşımını artırırken (van der Helm 2003), doğrudan etki ettiği zaman serebral arterlerde vazokonstriksiyona yol açmıştır (Dubocovich ve ark. 2003). Gündüz melatonin uygulaması, vücudun distal bölgelerinde vazodilatasyon nedeniyle vücut ısısını düşürmüştür (Krauchi ve ark. 1997; van den Heuvel ve ark. 1999; Pandi-Perumal ve ark. 2008). Melatoninin kan damarlarına etkileri noradrenerjik etkileri ve/veya NO'nin etkileri ile ilgili gibi görülmektedir (Ekmekcioglu 2006). Vazodilatör ve periferik direnç düşürücü etkisi vazopressin salınımının inhibisyonu, anti-noradrenerjik mekanizma veya NO potansiyalizasyonu ile ilişkili olabileceği iddia edilmiştir (Ekmekcioglu 2006).

### **2.3.2. Melatonin Reseptörleri**

Melatonin reseptörlerinin vücutta bulunduğu yerler beyin, retina, kalp-damar sistemi, kalp ventrikül duvarı, aort, koroner ve serebral arterler, karaciğer ve safra kesesi, duodenal enterositler, kolon, çekum ve ek vermiformis, deri, parotis, ekzokrin pankreas, böbrek, bağışıklık sistemi, trombositler, kahverengi ve beyaz adipositler, prostat ve meme epitel hücrelerinde, yumurtalık/granüloza hücreleri, miyometriyum, plasenta ve fetal böbrek hücreleridir (Uz ve ark. 2005; Hardeland 2012).

### **1. MT1: Melatonin reseptörü tip 1a, Mel 1a, ML1a, ML1, MTNR1A**

MT1 insandaki 4. kromozomda kodlanmıştır ve 351 aminoasitten oluşur (Li ve ark. 2013). MT1, çeşitli G-proteinlerine bağlanarak adenilat siklaz (AC) inhibisyonu oluşturmaktadır (Comai ve Gobbi 2014). MT1 reseptörleri, insan derisinde yaygın olarak bulunmuştur (Pandi-Perumal ve ark. 2008). Yaşlanma ve Alzheimer hastalığı esnasında SCN ve kortekste MT1 azalmıştır (Pandi-Perumal ve ark. 2008).

### **2. MT2: Melatonin reseptörü tip 1b, Mel 1b, ML1b, MTNR1B**

MT2 insandaki 11. kromozomda kodlanmıştır ve 363 aminoasitten oluşur (Li ve ark. 2013). MT2 çeşitli G proteinlerine bağlanarak AC inhibisyonu oluşturmuş ve cAMP üretimi azalmıştır (Levoye ve ark. 2006; Chaste ve ark. 2011). Buna ek olarak, çözünebilir guanilat siklaz (GC) yolağını inhibe etmiştir (Comai ve Gobbi 2014). MT2 reseptörleri deride normal ve malign melanositler ile ekrin ter bezlerinde yer almaktadır (Pandi-Perumal ve ark. 2008). MT2 reseptörleri ratlarda hipokampusta bulunan GABA-A reseptörü ile ilgili fonksiyonlarını inhibe etmiştir (Dubocovich ve ark. 2003). Alzheimer hastalığında, MT2 ekspresyonu azalmıştır. MT2 reseptörleri antidepresan aktiviteye katılmaktadırlar (Hardeland 2012). MT2 uyku bozuklukları, anksiyete, depresyon, Alzheimer hastalığı ve ağrı patofizyolojisi ve farmakolojisine katkıda bulunmuştur (Comai ve Gobbi 2014). MT2 reseptörlerinin hipnotik ajanların geliştirilmesi için yeni bir hedef olabileceğidüşünülmüştür (Comai ve Gobbi 2014). MT2 reseptörleri melatoninin anksiyolitik etkilerinden sorumludur. Farmakolojik çalışmalar MT2 reseptörlerinin uykuyu (özellikle NREMS) düzenlediğini ortaya koymuştur (Comai ve Gobbi 2014). MT2 ligandları seçici olmayan MT1/MT2 ligandları ile karşılaştırıldığında daha güçlü hipnotik özelliklere sahip olduğu iddia edilmiştir (Comai ve Gobbi 2014).

### **3. Mel1c: MTNR1C**

İnsanlarda mevcut değildir. Balık, kurbağa ve kuşlarda bulunmaktadır (Li ve ark. 2013). Tavukta, Mel1c ritmi MT1 ve MT2'nin tersidir. Mel1c seviyesi gündüz en yüksek, gece en düşük düzeydedir (Rada ve Wiechmann 2006; Li ve ark. 2013).

#### **4. MT3: ML2, NQO2, Kinon redüktaz 2 enzim, QR2**

MT3, kinonların elektron transfer reaksiyonlarını inhibe ederek oksidatif stresten korunmayı sağlayan redüktaz grubuna aittir (Pandi-Perumal ve ark. 2008). Bir detoksifikasyon enzimi olan MT3, karaciğer, böbrek, kalp, akciğer, bağırsak, kas ve kahverengi yağ dokusunda yer almaktadır (Ekmekcioglu 2006). Göz içi basıncın düzenlenmesine katıldığına dair kanıtlar bulunmuştur (Ekmekcioglu 2006).

#### **5. RZR/ROR $\alpha$ : Retinoid bağlantılı Orphan nükleer hormon reseptörü**

Bu reseptör ile melatonin, çekirdeğin retinoik asit reseptör süper ailesine uygun transkripsiyon faktörlerine bağlandığı tespit edilmiştir (Pandi-Perumal ve ark. 2008).

#### **6. GPR50: H9, ML1X: Melatonin ile ilgili Orphan reseptörü**

MEL1c'nin ortologudur (Dufourny ve ark. 2008). X kromozomunda (Xq28) kodlanmıştır ve 618 aminoasitten oluşmaktadır (Li ve ark. 2013). İnsanlar da dahil olmak üzere tüm memelilerde bulunur. Melatonin'e bağlanma özelliği yoktur (Ekmekcioglu 2006), ancak melatoninin MT1'e bağlanmasında etkilidir (Hirsch-Rodriguez ve ark. 2007). GPR50 kuşlarda ve balıklarda bulunmamaktadır (Gubitze ve Reppert 1999; Li 2013). GPR50'nin melatonine yakınlığı yoktur ancak MT1 ile dimerleştiğinde melatonin sinyalini inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Levoe ve ark. 2006; Chaste ve ark. 2010).

MT1 ve MT2 nöronal ve periferik dokularda dağılım göstermektedir (Ekmekcioglu2006; Pandi-Perumal ve ark. 2008). MT1 ve MT2 SCN'de yüksek yoğunluklarda (Liu ve ark. 1997) bulunduğu ve bunların ekspresyon seviyeleri, diüurnal ritim ile senkronize edildiği düşünülmektedir (Reiter 1991). SCN'ye ek olarak, fonksiyonel melatonin reseptörlerinin esas olarak beyinde (Dubocovich ve ark.2003) ve ovaryum (Clemensve ark.2001), testis (Frungeri ve ark.2005) arterler, kalp (Masana ve ark. 2002), karaciğer, böbrek (Naji ve ark. 2004), adipositler (Zalatan ve ark. 2001), bağışıklık sisteminde (Guerrero ve Reiter 2002; Skwarlo-Sonta ve ark. 2003;Dubocovich ve Markowska2005) lokalize oldukları belirlenmiştir.

MT1 ve MT2 hücre yüzeyine yapıştıklarında, etkilerini G protein vasıtasıyla oluşturmuşlardır. MT1 aktivasyonu, PKA inhibisyonu ile birlikte forskolin tarafından



uyarılan cAMP oluşumunun inhibisyonuna yol açmaktadır (Ekmekcioglu 2006). Benzer şekilde, MT2 aktivasyonu, forskolin tarafından uyarılan cAMP oluşumunun inhibisyonuna yol açmıştır (Ekmekcioglu 2006). Buna ek olarak, cGMP oluşumunu inhibe etmiştir (Ekmekcioglu 2006). Membran reseptörleri temelde merkezi sinir sisteminde bulunurken, RZR/ROR $\alpha$  hem perifer hem de beyinde bulunmuştur (Carlberg 2000). Membran reseptörleri ve spesifik agonistleri sirkadiyen ritimle ilişkili iken, RZR/ROR $\alpha$  çevresindeki immüno-modülasyondan, hücresel büyüme ve kemik farklılaşmasından sorumlu görünmektedir (Carlberg 2000). PKC- $\alpha$  aktivasyonu, melatonin etkisinin oluşumunda kritik bir adım olarak düşünülmüştür (Pandi-Perumal ve ark. 2008).

MT'lerinde etkili farmakolojik ajanların geliştirilmesi, antihipertansif, anti-kanser veya immün sistemi uyarıcı etkiler ile ilişkili olabilmüş veya uykuya dalmayı kolaylaştırabilmişlerdir (Ekmekcioglu 2006). Anti-inflamatuar etkisine ilaveten, immün sistemi uyarıcı etkisi otoimmün bozukluklarda istenmeyen bir durum olarak ortaya çıkmıştır ve melatonik ilaçlar bu hastalarda kontrendike olabilmıştır (Hardeland 2012). Örneğin, melatonin, romatoid artrit semptomlarını proinflamatuar sitokinleri uyararak şiddetlendirmiştir (Forrest ve ark. 2007).

### **2.3.2.1. G proteini ile birleşen melatonin reseptörleri**

Melatonin, yedi geçişli transmembran G proteinine bağlı melatonin reseptörleri ile etkileşime girerek fizyolojik etkilerinin çoğunu meydana getirmektedir. İlk MT, sadece memeli olmayan türlerde ekspre edilen *Xenopus laevis* melanofor mRNA'larından klonlanmıştır (Ebisawa ve ark. 1994). Ardından insan melatonin reseptörlerinin iki farklı formunu kodlayan cDNA'lar klonlanıp ve MT1 ve MT2 olarak gösterilmiştir (Reppert ve ark. 1994; Reppert ve ark. 1995). İki reseptör alt türünün bağlanma özellikleri benzerdir ve melatonin için subnanomolar afiniteler sergilemektedir (Dubocovich ve ark. 2005).

Diğer birçok G proteine bağlı reseptör (GPCR) gibi, melatonin reseptörleri potansiyel olarak hücre dışı N-terminallerinde glikosile edilmişlerdir. Fonksiyonel düzenlemeleri içeren hücre içi C terminali kuyruklarında PKC, kazein kinaz 1 ve 2 ve PKA fosforilasyon bölgeleri bulunmaktadır (Dubocovich ve ark.2005).

### 2.3.2.2. Melatonin reseptörleri sinyalleşmesi

Melatonin reseptörleri için sinyal iletim yolları, farklı dokular ve hücre tipleri arasında değişiklik göstermektedir (Von Gall ve ark. 2002; Witt-Enderby ve ark, 2003). Rekombinant melatonin reseptörleri kullanılarak MT1'in AC inhibisyonuna ve PLC- $\beta$  aktivitesine aracılık eden farklı G proteinlerine bağlandığı gösterilmiştir. Böylece, MT1 aktivasyonu,  $G_{i\alpha 2}$ ,  $G_{i\alpha 3}$  ve  $G_{\alpha q}$  (Brydon ve ark. 1999) ve  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha z}$  ve  $G_{\alpha 16}$  (Ho ve ark. 2001; Chan ve ark. 2002) dahil olmak üzere çok çeşitli G proteinlerinin aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu sistemlerin bazılarında, melatonin, PKA aktivitesinde (Morgan ve ark. 1994) ve nükleer faktör CREB fosforilasyonu (cAMP yanıt elementi bağlayan protein) azalmalar da dahil olmak üzere (McNulty ve ark. 1994) cAMP sinyal iletim kaskadında (Niles ve Hashemi 1990; Brydon ve ark. 1999) engelleyici etkilere sahiptir. Hipofiz PT'sinde (pars tuberalis) MT1 aktivasyonunun ana etkisi, cAMP birikimini inhibe etmektir (Morgan ve ark. 1994). Bununla birlikte, klonlanmış MT1 ile transfekte edilmiş COS-7 hücrelerinde (Chan ve ark. 2002) ve insan nevroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde (Schuster ve ark. 2005) melatonin cAMP'nin uyarılmasına neden olmuştur. Bu mekanizma tam olarak tanımlanmış olmamasına rağmen, bu uyarıcı etkinin  $G_i$  veya  $G_s$  proteinleri ile etkileşimden bağımsız olduğu ve geçici olarak bir  $Ca^{+2}$ -CaM sinyal iletim yolu ve c-Jun N-terminal kinaz aktivasyonu ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Chan ve ark. 2002; Schuster ve ark. 2005).

MT2, fosfoinositid üretimi, AC'ın inhibisyonu ve çözünebilir GC yolağının inhibisyonu (Boutin ve ark. 2005) dahil bir dizi sinyal iletim yoluna bağlanmıştır. İnsan MT2 ile transfekte edilen NIH3T3 hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda melatoninin cAMP sentezini inhibe ettiği bulunmuştur (Reppert ve ark. 1995; Jones ve ark. 2000). Öte yandan insan iyi huylu ve prostat kanseri hücrelerinde melatonin, muhtemelen G protein sinyalleşmesine (RGS) düzenleyici etkileri yoluyla cGMP (siklik 3',5'-siklik guanozin monofosfat) düzeylerinde bir artış ile ilişkilendirilmiştir (Gilad ve ark. 1997a, 1998a).

Melatonin sıçan hipotalamusunda ve tavşan retinasında uyarılan DA salınımını inhibe etmiştir (Zisapel ve Laudon 1982; Dubocovich 1983; Zisapel 2001b). Bu inhibisyon uyarılmış doku tarafından  $Ca^{+2}$  alımının bastırılması ile ilişkilendirilmiştir (Zisapel ve Laudon 1983; Vacas ve ark. 1984). Hipotalamusta

melatoninin  $Ca^{+2}$  alımına iki yönlü etkisi, günün farklı zamanlarında belgelenmiştir (Rosenstein ve ark. 1991). MT1 aktivasyonu aynı zamanda sitozolik  $Ca^{+2}$  ve inositol fosfat birikimini geçici olarak yükseltmektedir (Brydon ve ark. 1999; Roka ve ark. 1999).

Amfibi dermal melanoforlarında melatonin, boğmaca toksinine duyarlı G proteini aracılığıyla melanin hareketini etkilemiş (White ve ark. 1987) ve bu pineal hormon cAMP birikimini azaltmıştır (Abe ve ark. 1969). Yüksek konsantrasyonda melatonin reseptörleri içeren alanların belirlenmesi, endojen MT'leri tarafından aktive edilen sinyal iletim yollarının incelenmesine olanak vermiştir. Bu çalışmalar, kültürdeki hücelere transfeksiyon yoluyla getirilen rekombinant MT'lerinin çalışmaları ile tamamlanmışlardır.

PT'de, pineal hormonun baskın hücrel etkisi, forskolin ile stimüle edilen cAMP birikimini inhibe etmiştir (Carlson ve ark. 1989; Morgan ve ark. 1989; Vanecek ve Vollrath 1989). Melatoninin bu etkisi,  $G_i$  proteinine bağlanan *pertussis* (boğmaca) toksinine duyarlıdır (Carlson ve ark. 1989; Morgan ve ark. 1996). Bununla birlikte kolera toksine duyarlı bir bileşen,  $G_o$  proteini ile bağlanarak forskolinle uyarılan cAMP birikimini inhibe etmiştir (Morgan ve ark. 1995). Forskolin, AC'in farmakolojik aktivatörüdür. Aslında, melatonin cAMP'ye duyarlı genlerin bir transkripsiyonal aktivatörü olan CREB fosforilasyonunu inhibe etmiştir (McNulty ve ark. 1994; Kopp ve ark. 1997; von Gall ve ark. 1998, 2000). Melatoninin SCN'deki PLC aktivitesini etkilediği de bildirilmiştir (McArthur ve ark. 1997; Hunt ve ark. 2001). Bu son derece hızlı cevabın farmakolojik karakterizasyonuna dayanarak, bir MT2'nin aracılık ettiği görülmektedir (Hunt ve ark. 2001).

Rekombinant insan MT1'in uyarılması, sadece forskolin ile indüklenen cAMP birikiminin inhibe edilmesini değil, aynı zamanda prostaglandin  $F2\alpha$ 'nın indüklediği arakidonat salınımını ve fosfoinositid hidrolizi de güçlendirmiştir (Godson ve Reppert 1997; Brydon ve ark. 1999; Roka ve ark. 1999). Ayrıca, MT1 aktivasyonu, sitozolik  $Ca^{+2}$  iyonu konsantrasyonunda ve inositol fosfat birikiminde geçici bir yükselmeye neden olmuştur (Brydon ve ark. 1999; Roka ve ark. 1999). Kopresipitasyon deneyleri, MT1'in  $G_{i2}$ ,  $G_{i3}$  ve  $G_{q/11}$  proteinlerine bağlandığını göstermiştir (Brydon ve ark. 1999). MT1 reseptörlerini stabil olarak ifade eden hücre

hatlarında, bu diferansiyel G proteini bağlanmasının işlevsel önemi daha net belirlenmiştir.  $G_{i2}$  ve  $G_{i3}$  proteinleri, pertussis toksini duyarlı bir mekanizma yoluyla AC inhibisyonuna aracılık ederken, pertussis toksine duyarsız  $G_{q/11}$  proteini PLC- $\beta$ 'yi aktive etmek için bağlanmıştır (Brydon ve ark. 1999; Roka ve ark. 1999).

MT1'de olduğu gibi, rekombinant MT2 de pertussis toksine duyarlı G proteini aracılığıyla AC aktivitesini inhibe etmek için bağlanmıştır (Reppert ve ark.1995a). Ayrıca rekombinant MT2 (ancak MT1 değil) aktivasyonu, çözünebilir GC yolağı aracılığıyla cGMP seviyelerini de inhibe etmektedir (Petit ve ark. 1999).

Melatonin reseptörlerinin aktivasyonu, heterotrimerik G proteinlerinin ayrışmasına yol açmış ve  $G_{\alpha}$  altbirimi ve  $G_{\beta\gamma}$  kompleksi böylece çeşitli downstream efektörleriyle etkileşime girmiştir. MT'leri boğmaca toksini (PTX) duyarlı  $G_i$  proteinleri ( $G_{\alpha i2}$  ve  $G_{\alpha i3}$  izoformları) vasıtasıyla öncelikli olarak AC engeller (Brydon ve ark.1999). cAMP'deki düşüş, daha sonra PKA aktivitesini ve nükleer faktör CREB fosforilasyonunu bastırır. Melatoninin AC/cAMP yolu ile clock gen ekspresyonu ritmik düzenlenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir (Masana ve Dubocovich2001).Melatonin kaynaklı sinyal kaskadı, fosforile CREB oluşumunda pituitar AC aktive edici peptid etkisine karşı SCN'nin sirkadiyen ritmini modüle edebilmektedir (Jin ve ark. 2003).

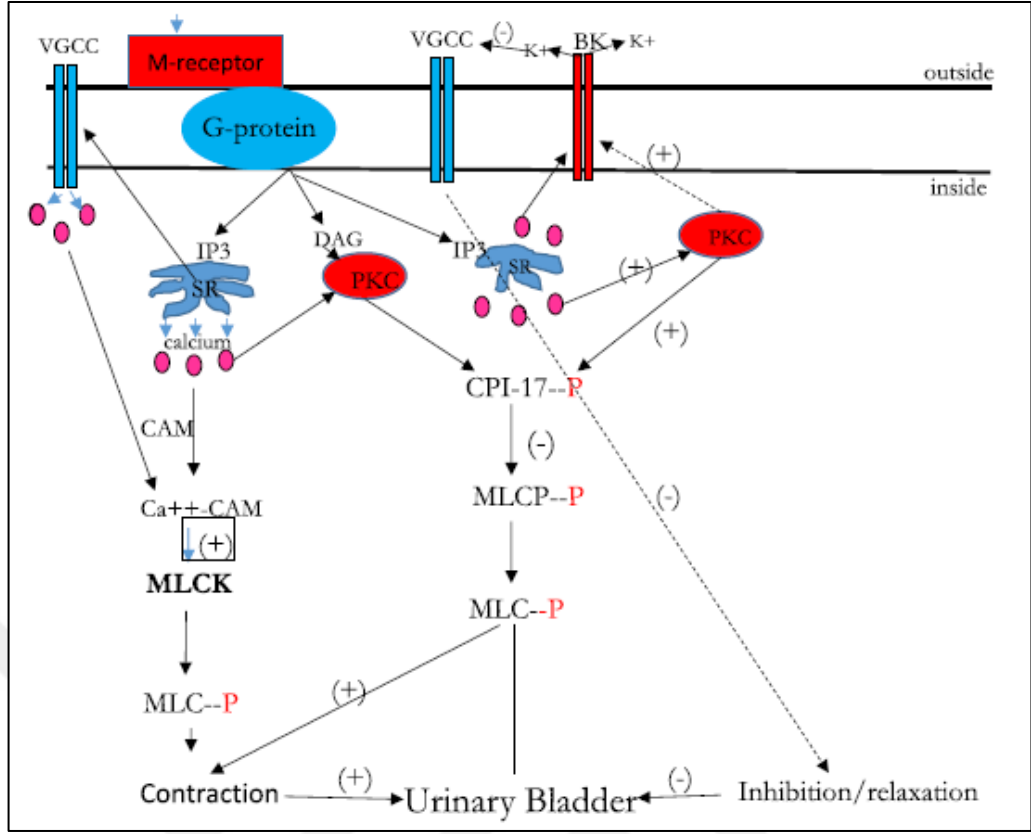
$G_i$ 'ye bağlı MT, cAMP'ye bağımlı sinyalizasyona ilaveten, sinyal yayılımı için PTX'e duyarsız  $G_s$ ,  $G_z$  ve  $G_{16}$ 'yi kullanabilir (Chan ve ark. 2002). Melatonin,  $G_q$  bağlanması veya  $G_i$ 'nin  $\beta\gamma$  alt birimlerinin ayrışması yoluyla PLC aktivitesini uyarır,  $PIP_2$ 'yi DAG ve  $IP_3$ 'a dönüştürür. İkinci habercilerin yüksek seviyesi, kalmodulin kinazlar (CaMK) aracılığıyla PKC ve  $Ca^{+2}$  sinyalini aktive ettiği ve böylece ERK, JNK ve p38 de dahil olmak üzere mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) kaskadını uyardığı belirlenmiştir (Kyriakis ve ark.1994).

Hematopoetik hücrelerde MT1 ve  $G_{16}$ 'nın varlığı, hematopoietik gelişim ve immün regülasyonda melatonin sinyalizasyonunun önemli bir rol oynadığını düşündürmüştür. Aslında, melatonin sitokin üretimini düzenleyebilir ve melatonin IL-2 indüksiyonu ile IL-6 aracılı monosit aktivasyonunu tetikleyerek T yardımcı hücreleri aktive ettiği bildirilmiştir (Garcia-Mauriño ve ark. 1997).

### 2.3.2.3. Melatonin reseptörleri ve kontraksiyon

İşlevsel olarak MT1 ve MT2'nin farklı fizyolojik rolleri vardır. MT1'lerin aktivasyonu vazokonstriksiyona sebep olurken MT2'lerin aktivasyonu vazodilatasyona yol açmaktadır (Pandi-Perumal ve ark. 2008). Bunlara ilaveten MT1, melatoninle düzenlenmiş kardiyak vazokonstriksiyona aracılık etmesine karşın (Liu ve ark. 1997; Masana ve ark. 2002; Jin ve ark. 2003), MT2 kalp damarlarını genişletir ve inflamasyonun yanı sıra immün yanıtları modüle etmiştir (Drazen ve Nelson 2001; Drazen ve ark. 2001; Jin ve ark. 2003)

MT1 diğer iyon akışlarını ve spesifik iyon kanallarını da düzenleyebilmiştir.  $Ca^{+2}$  ile aktive edilmiş  $K^{+}$  kanalı ( $BK_{Ca}$ )'nın inhibisyonu, MT1'e bağlı vazokonstriktör etkilerinin temelini oluşturmuştur (Geary ve ark. 1997, 1998). Bu durumda kanal blokajı,  $BK_{Ca}$  kanallarını fosforile eden cAMP-PKA yolağındaki bir azalmadan kaynaklanabilir. İçeride doğrudan  $K^{+}$  kanalları (Kir), melatonin için bir başka potansiyel hedefdir. *Xenopus* oositlerinde (Nelson ve ark. 1996) veya AtT20 hücrelerinde (Nelson ve ark. 2001) ekspres edilen MT1,  $G_i$  proteinlerinin  $\beta\gamma$  alt birimlerini içerebilen bir PTX'e duyarlı mekanizma aracılığıyla GIRK'nı (Kir3 içeride doğrudan  $K^{+}$  kanalları) aktive etmiştir. Kir3 kanalları aktivasyonunun melatonin aracılı  $K^{+}$  iletkenlik artışlarının temelini oluşturabileceği ileri sürülmüştür (Jiang ve ark. 1995) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Mesane işlevinin düzenlenmesinde rol oynayan PKC sinyal yolları (Joseph ve Anna 2015).

#### 2.3.2.4. Melatonin reseptör agonistleri

Klonlanmış MT'lerinin varlığına bağlı olarak, günümüzde geniş bir agonist ve antagonist dizisi bulunmaktadır (Delagrang ve ark. 2003).

- Ramelteon (Rozerem©, Takeda, Japonya; TAK-375): Seçici olmayan (MT1/MT2) bir melatonin reseptör agonistidir.
- Circadin (Circadin©, Neurim, İsrail ve UK): Melatonin kontrollü salım tabletleridir.
- TIK-301: Melatonerjik agonist ve serotonerjik antagonist bir ilaçtır.
- Tasimelteon (Hetlioz, Vanda Pharmaceuticals, ABD): 24 saatlik uyku-uyanma bozukluğunun tedavisi için Ocak 2014'te FDA tarafından onaylanmıştır.
- Agomelatin (Valdoxan©, Servier, Fransa: S20098): Seçici olmayan (MT1/MT2) melatonin reseptör agonisti ve serotonerjik 5-HT<sub>2c</sub> antagonistidir.

Avrupa İlaç Ajansı tarafından 2008 yılında erişkinlerde majör depresyonun tedavisi için onaylanmıştır (de Bodinat ve ark. 2010; Hardeland 2012; Comai ve Gobbi 2014). Anksiyolitik ve antidepresan etkilere sahip bildirilen ilk melatonerjik ilaçtır (Pandi-Perumal ve ark. 2008). Agomelatinin yarı ömrü 1-2 saattir (Hardeland ve ark. 2012). 5HT<sub>2c</sub>'nin inhibisyonu doğrudan antidepresan etkisinden sorumludur (Millan ve ark. 2003). Agomelatin'in avantajı, antidepresan etkisinin daha iyi olması değil, antidepresan etkileri ile birlikte uyku üzerinde iyileştirici etkisi olmasıdır. Aslında, konvansiyonel antidepresanlar genellikle uyku bozukluklarını tetiklemişlerdir (Hardeland ve ark. 2012). Agomelatin temelde CYP1A1, CYP1A2 ve CYP2C9 tarafından metabolize edilmektedir (Hardeland 2009).

### **2.3.2.5. Melatonin reseptör antagonistleri**

Bazı seçici ilaçlar tanımlanmış olmasına rağmen, genel olarak hiçbir ilaç sadece bir MT alt tipini bağlamaz. Önemli Melatonin antagonist farmasotik maddeleri aşağıdaki şekildedir;

- Luzindol: Rekabetçi MT2 antagonisti
- S29434: En kuvvetli QR2 inhibitörü ve MT3 ligandı (Ferry ve ark. 2010).
- 4P-PDOT: MT2 seçici ligandı (Dubocovich ve ark. 2003). Sıçan SCN'sinde, nöronal ateşleme hızı, 4P-PDOT sinyali aracılığıyla PKC'yi aktive ederek ortaya çıkmaktadır. Bu hipotezi desteklemek için hem luzindol hem de 4P-PDOT melatonin ile PKC aktivasyonunu tamamen antagonize etmiştir (Godson ve Reppert, 1997; Sugden ve ark. 1999).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Yapılan çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen deney hayvanları ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nun 2016-035 kararı ile onaylanarak Necmettin Erbakan Üniversitesi BAP birimi tarafından 141418003 numaralı proje ile desteklendi.

#### 3.1. Deney Hayvanlarının Bakım Ve Beslenmeleri

Çalışmada Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen, 200-250 g ağırlığında 24 adet Wistar cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda,  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  oda sıcaklığında, nem oranı  $\%50\pm 5$  olan, iyi havalandırılan (15 kez/saat  $\%100$  temiz hava) plastik kafeslerde tutuldu. Hayvanlar cam şişelerdeki çeşme suyuyla ve pelet şeklindeki özel sıçan yemleriyle beslendi (Tablo 3.1).

Sıçan Beslenmesinde Kullanılan Yemin İçeriği	
Buğday	150 g
Mısır	100 g
Arpa	270 g
Kepek	80 g
Soya	294 g
Balık Unu	80 g
Tuz	6 g
*Kavimix VM 23-Z	2 g
Methionin	2 g
**DCP	16 g
*1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D3, 12 mg E, 0.8 mg K3, 0.8 mg B1, 2.4 mg B2, 1.2 mg B6, 0.006 mg B12 vitaminleri, 16 mg Nikotin amid, 3.2 mg Cal. D. Panth., 0.32 mg Folik asid, 0.02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0.8 mg I, 0.2 mg Co, 0.06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.	
**% 18 fosfor, %25 kalsiyum, %0.2 flor'dan oluşur.	

**Tablo 3.1.** Kullanılan sıçan yeminin içeriği (g/kg).



### 3.2. Krebs Solüsyonu

Krebs solüsyonu in vivo ortamdaki fizyolojik şartların devamlılığını belli ölçülerde in vitro ortamda da sağlayan bir çözeltilidir. İçeriği itibariyle mesane destrüktör düz kas hücrelerinin kasılabilirlik özelliklerini in vitro olarak sürdürebilmelerine optimal düzeyde imkan sağlamaktadır. Deneyler öncesinde günlük hazırlanan Krebs solüsyonu pH 7.4 e ayarlanarak kullanıldı (Tablo 3.2).

Krebs – Henseleit Tampon Solüsyonu İçeriği	
NaCl	118 mM/L
KCl	4,7 mM/L
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM/L
Glikoz	1,5 mM/L
CaCl <sub>2</sub>	2,4 mM/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,18 mM/L
NaHCO <sub>3</sub>	15,8 mM/L
EDTA	0,016 mM/L

**Tablo 3.2.** Krebs solüsyonu içeriği mM/L olarak yukarıdaki konsantrasyonlarda hazırlanmış olup pH 7.4'e ayarlanmıştır.

### 3.3. İzole Organ Banyosu Sistemi

Çalışmada kullanılan izole organ banyosu, mesane dokusundan hazırlanan düz kas şeritlerinin in vitro ortamda canlılığını sürdürmenin yanında maruz kaldığı kimyasal maddelere karşı biyolojik aktivitelerini tespit etmek için kullanıldı. Mevcut sistemde dört ayrı kas şeridi ile aynı anda çalışılabilmektedir (Şekil 3.1). Sistemin üniteleri aşağıdaki şekildedir:

1. Organ banyosu
2. O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> karışım tüpü
3. Termostatlı dolaşım pompası
4. Amplifikatör
5. Kayıt ünitesi



Şekil 3.1. İzole organ banyosu sistemi.

### 3.3.1. Organ Banyosu

Çift çeperli yapıya sahip olan izole organ banyosu sistemi (MAY IOBS 99), hazneler, depo, stant ve sıvı-gaz taşıma aparatlarından oluşmaktadır. Mevcut sistem, 10 ml hacimde dört adet hazne aynı anda kullanılabilir şekilde tasarlanmıştır. Hazneler de tüm sistem gibi çift çeperli yapıdadır. Haznelerin dış çeperinde termosirkulatörde ısıtılmış distile su sirküle olmaktadır. İç çeperde ise Krebs solüsyonu yer alır. Mesane şeritlerinin bir ucu hazne içinde diğeri hazne dışında bulunan iki çengel arasına ipek iplik aracılığıyla asılmaktadır. Şeritlerin yerleştirildiği iç çeperde bütün deneysel uygulamalar gerçekleştirilmektedir.

Krebs solüsyonunun depolandığı kısım da çift çeperlidir. Çeperler arasında bulunan termosirkülerden gelen distile su depo halindeki Krebs solüsyonunu gerekli sıcaklıkta tutmaktadır. Buradaki solüsyon istenilen miktarda kullanılmaktadır.

Sıvı-gaz taşıma aparatları ise Krebs solüsyonunun tüm organ banyosu boyunca dolaşımını ve gaz karışımının haznelere ulaşmasını sağlamaktadır.

### 3.3.2. O<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> Karışım Tüpü (HABAS)

Düz kasların in vitro ortamda kasılabilmesi için gerekli olan gaz karışımı optimal olarak %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub>'den oluşmaktadır. Organ banyosunda çalışma

yapıldığı süre boyunca haznenin alt bölgesindeki girişten %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> karışımıyla haznedeki Krebs solüsyonu sürekli olarak gazlandırılmıştır.

### 3.3.3. Termostatlı Dolaşım Pompası

Termostatlı dolaşım pompası, içerisinde bulunan distile suyu istenen sıcaklığa ayarlayarak izole organ banyosunun çift çeperli bütün bölümlerinde sirküle olarak ısınmasını sağlayan bir cihazdır.

### 3.3.4. Amplifikatör

Transduserden alınan elektriksel sinyalleri amplifiye ederek (büyütür) data analiz sistemine aktarır. Elektriksel sinyaller orjinal trasedekilerle uyumlu genlik parametreleri olarak kayıt sistemine iletilir.

### 3.3.5. Kayıt Ünitesi

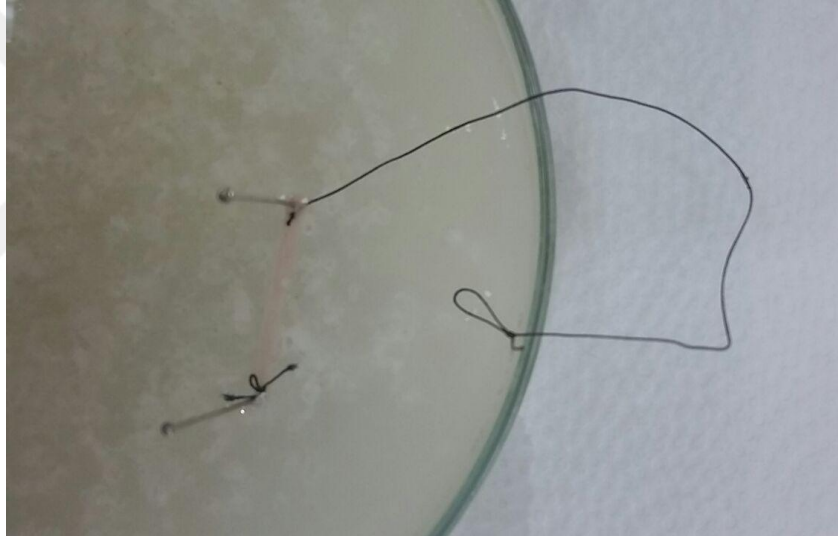
Veri kayıt ve analiz sistemi bilgisayar ve yazılım programından oluşmaktadır. Kayıt ünitesinde, organ banyosundaki düz kas şeritlerinin kasılmalarının oluşturduğu genlik parametreleri eşzamanlı olarak kaydedilmektedir. Bu kayıtlar daha sonra analiz edilerek, her bir kas şeridinde kimyasal madde uygulamalarından önce ve sonraki sürelerde ortaya çıkan kasılma parametreleri genlik olarak belirlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. İzole organ banyosu kayıt sisteminde kontraksiyonların görüntülenmesi ve kaydedilmesi.

### 3.4. Mesane Şeritlerinin Hazırlanması

Deneylede kullanılan sıçanların bakım ve beslenme şartlarına herhangi bir kısıtlama yapılmadı. Çalışmada Wistar cinsi 8 – 20 haftalık, 200 – 250 g arası 24 adet dişi sıçan kullanıldı. Servikal dislokasyon yöntemi ile sıçanlar ötenazi edildi. Medyan hattın abdomen dikkatlice açıldı ve mesane çıkarılarak içerisinde Krebs solüsyonu bulunan petri kabına alındı. Mesane çevresinde bulunan bağ dokular temizlendi. Daha sonra mesane boyun kısmından apex yönünde longitudinal bir kesi ile açılarak mesaneden vertikal yönde 2X10 mm ebadında iki kas şeridi hazırlandı (Ayar ve ark. 2001). Hazırlanan şeritler ipek iplerle bağlandı (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** Mesane düz kas şeritlerinin hazırlanması

Hazırlanan mesane düz kas şeritleri %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> ile gazlandırılan Krebs solüsyonu içeren organ banyosu haznesine alt ucu banyo tabanında yer alan çelik çengele, üst ucu ise transdusere sabitlenen çelik çengele yerleştirildi (Şekil 3.4).



**Şekil 3.4.** İzole organ banyosuna yerleştirilmiş mesane düz kas şeridi

### **3.5. Agomelatinin Hazırlanması**

Çalışmada agomelatin (Pcode:2415 Sigma, USA) kullanıldı. 42.5 mg agomelatin 10 ml distile suda eritildi. Hazırlanan çözelti vortekste karıştırılarak çözdürüldü. Agomelatin çözeltileri küçük plastik ependorf tüplere ayrılarak organ banyosuna uygulanana kadar +4°C'de saklandı. Agomelatin çözmek için kullanılan çözelti ACh (Pcode:3050 Sigma, USA) ile indüklenmiş kasılmalara uygulandı. Çözücünün kontraksiyonlar üzerinde etkisiz olduğu gözlemlendi.

#### **3.5.1. Agomelatin Uygulaması İçin Deney Protokolü**

Deneylerde sıçanlardan elde edilen mesane şeritleri kullanıldı. 8 hayvandan çıkarılan şeritlere 2 farklı protokol halinde uygulamaları yapıldı. 1. protokolde spontan kasılmalar üzerine yalnızca  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi uygulandı. 2. protokolde ise,  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi ile indüklenen kasılmalar üzerindeki agomelatin etkisi test edildi. Her iki protokol grubundaki hayvanlar hergün sabah aynı saatlerde dekapite edildi (08:00-10:00). Dekapite edilen sıçanların median hattın abdomen bölgeleri açılarak mesaneleri hızlı ve dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Alınan mesane doku örnekleri, içerisinde Krebs solüsyonu bulunan petri kaplarına alındı. Mesanelerden 2X10 mm boyutunda kesitler hazırlandı. Hazırlanan kesitler izole organ banyosunda bulunan cam haznelerin içindeki düzeneğe 1 g gerim uygulanarak yerleştirildi ve izometrik kasılmalar kaydedildi. Uygulanan gerim düzeyi bütün deney periyodunda sabit tutuldu.

Birinci protokolde 15 dakikada bir yıkama yapılarak yaklaşık olarak 45 dakikalık bir uyum periyodu sonrasında spontan olarak kasılan mesane stripleri  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi ile indüklendi. Protokole işlem süresince müdahale edilmedi. İkinci protokolde ise her bir sıçandan alınan stripler yerleştirildikten sonra, organ banyosunda yine 15 dakikada bir yıkama yapılarak yaklaşık olarak 45 dakikalık bir uyum periyodu sonrasında spontan olarak kasılan mesane stripleri  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi ile indüklendi. Kasılmaların oluşturduğu platonun gözlenmesini takiben beş dakika arayla ve sırasıyla  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M agomelatin kümülatif olarak ilave edildi. Oluşan etki kayıt altına alındı.

Kasılmaların genlik (g) parametreleri aritmetik ortalama (AO)  $\pm$  standart hata (SH) değerleri olarak belirlendi.

### **3.6. Melatoninin Hazırlanması**

Çalışmada kullanılan melatonin (Pcode:1001445325, Sigma, USA) 23 mg 1 ml etil alkolde (Pcode:32205, Sigma, USA) eritildi. Hazırlanan çözelti vortekste karıştırılarak çözdürüldü. Melatonin çözeltileri hemen uygulama öncesi hazırlandı ve hazırlanan çözeltiler küçük plastik endorf tüplere ayrılarak organ banyosuna uygulanana kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Melatoninini çözmek için kullanılan etil alkol ACh (Pcode:3050 Sigma, USA) ile indüklenmiş kasılmalara uygulandı. Çözücünün kontraksiyonlar üzerinde etkisiz olduğu gözlemlendi.

#### **3.6.1. Melatonin Uygulaması İçin Deney Protokolü**

Deneylerde sıçanlardan elde edilen mesane şeritleri kullanıldı. 8 hayvandan çıkarılan şeritlere 3 farklı protokol halinde uygulamaları yapıldı. 1. protokolde spontan kasılmalar üzerine yalnızca  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi uygulandı. 2. protokolde  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi uygulanan kas şeritlerine melatoninin çözücüsü olan etil alkol uygulandı. 3. protokolde ise,  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi ile indüklenen kasılmalar üzerindeki melatonin etkisi test edildi. Her iki protokol grubundaki hayvanlar hergün sabah aynı saatlerde dekapite edildi (08:00-10:00). Dekapite edilen sıçanların median hattın abdomen bölgeleri açılarak mesaneleri hızlı ve dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Alınan mesane doku örnekleri, içerisinde Krebs solüsyonu bulunan petri kaplarına alındı. Mesanelerden  $2 \times 10$  mm boyutunda kesitler hazırlandı. Hazırlanan kesitler

izole organ banyosunda bulunan cam haznelerin içindeki düzeneğe 1 g gerim uygulanarak yerleştirildi ve izometrik kasılmalar kaydedildi. Uygulanan gerim düzeyi bütün deney periyodunda sabit tutuldu.

Birinci protokolde 15 dakikada bir yıkama yapılarak yaklaşık olarak 45 dakikalık bir uyum periyodu sonrasında spontan olarak kasılan mesane stripleri  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi ile indüklendi. Protokole işlem süresince müdahale edilmedi. İkinci protokolde her bir sıçandan alınan stripler yerleştirildikten sonra, organ banyosunda 15 dakikada bir yıkama yapılarak yaklaşık olarak 45 dakikalık bir uyum periyodu sonrasında spontan olarak kasılan mesane stripleri  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi ile indüklendi. Kasılmaların gözlenmesinden 20 dakika sonra ve 15 dakika arayla 1, 10, 100, 250  $\mu$ l etil alkol kümülatif olarak ilave edildi. Üçüncü protokolde ise her bir sıçandan alınan stripler yerleştirildikten sonra, organ banyosunda yine 15 dakikada bir yıkama yapılarak yaklaşık olarak 45 dakikalık bir uyum periyodu sonrasında spontan olarak kasılan mesane stripleri  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi ile indüklendi. Kasılmaların gözlenmesinden 20 dakika sonra ve 15 dakika arayla 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 2.5 mM melatonin kümülatif olarak ilave edildi. Oluşan etki kayıt altına alındı.

Kasılmaların genlik (g) parametreleri aritmetik ortalama (AO)  $\pm$  standart hata (SH) değerleri olarak belirlendi.

### **3.7. 4P-PDOTun Hazırlanması**

Çalışmada 4PPDOT (Pcode:22415, Sigma, USA) kullanıldı. 14 mg 4PPDOT 1 ml dimetil sülfoksit (DMSO)'de (Pcode:101600818, Sigma, USA) eritildi. Hazırlanan çözelti vortekste karıştırılarak çözdürüldü. Hazırlanan 4PPDOT çözeltileri küçük plastik ependorf tüpe alınarak organ banyosunda uygulanana kadar  $-20$  °C'de saklandı. 4PPDOT'u çözmek için kullanılan DMSO miktarı ACh ile indüklenmiş kasımlara uygulandı. Çözücünün kontraksiyonlar üzerinde etkisiz olduğu gözlemlendi.

### 3.7.1. 4P-PDOT Uygulaması İçin Deney Protokolü

Deneilerde sıçanlardan elde edilen mesane şeritleri kullanıldı. 8 hayvandan çıkarılan şeritlere 2 farklı protokol halinde uygulamaları yapıldı. 1. protokolde spontan kasılmalar üzerine yalnızca  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi uygulandı. 2. protokolde  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi uygulanan kas şeritlerine 4P-PDOT çözücüsü olan DMSO uygulandı. 3. protokolde ise  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi ve 2 mM melatonin ile indüklenen kasılmalar üzerine 4PPDOT etkisi test edildi. Her iki protokol grubundaki hayvanlar hergün sabah aynı saatlerde dekapite edildi (08:00-10:00). Dekapite edilen sıçanların median hattın abdomen bölgeleri açılarak mesaneleri hızlı ve dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Alınan mesane doku örnekleri, içerisinde Krebs solüsyonu bulunan petri kaplarına alındı. Mesanelerden 2X10 mm boyutunda kesitler hazırlandı. Hazırlanan kesitler izole organ banyosunda bulunan cam haznelerin içindeki düzeneğe 1 g gerim uygulanarak yerleştirildi ve izometrik kasılmalar kaydedildi. Uygulanan gerim düzeyi bütün deney periyodunda sabit tutuldu.

Birinci protokolde 15 dakikada bir yıkama yapılarak yaklaşık olarak 45 dakikalık bir uyum periyodu sonrasında spontan olarak kasılan mesane stripleri  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi ve 2 mM melatonin ile indüklendi. Protokole işlem süresince müdahale edilmedi. İkinci protokolde her bir sıçandan alınan stripler yerleştirildikten sonra, organ banyosunda 15 dakikada bir yıkama yapılarak yaklaşık olarak 45 dakikalık bir uyum periyodu sonrasında spontan olarak kasılan mesane stripleri  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi ve 2 mM melatonin ile indüklendi. Kasılmaların gözlenmesinden 10 dakika sonra 10 dakika arayla 0.8 ve 8 µl DMSO kümülatif olarak ilave edildi. Üçüncü protokolde ise her bir sıçandan alınan stripler yerleştirildikten sonra, organ banyosunda yine 15 dakikada bir yıkama yapılarak yaklaşık olarak 45 dakikalık bir uyum periyodu sonrasında spontan olarak kasılan mesane stripleri  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi ve 2 mM melatonin ile indüklendi. Kasılmaların gözlenmesinden sonra 10 dakika sonra 10 dakika arayla 0.01 mM, ve 0.1 mM 4PPDOT kümülatif olarak ilave edildi. Oluşan etki kayıt altına alındı.

Kasılmaların genlik (g) parametreleri aritmetik ortalama (AO) ± standart hata (SH) değerleri olarak belirlendi.



### 3.8. İstatistiksel Metot

Çalışmada gerekli olan istatistikler için SPSS 18.0 paket programı kullanıldı. Sayısal değişkenler ortalama (AO)  $\pm$  standart hata (SH) şeklinde verildi. Sonuçların değerlendirilmesinde Friedman Testi kullanıldı. Ayrıca sonuçlara ilişkin değerler grafikler ile görselleştirildi. Genlik değişkenlerinin tekrarlı ölçüm değerlerini karşılaştırmak için Friedman İki Yönlü Varyans Analizi kullanıldı. Farklılıkların anlamlı çıkması üzerine (Post-Hoc) yapıldı.  $p < 0.01$  değerleri anlamlı kabul edildi.



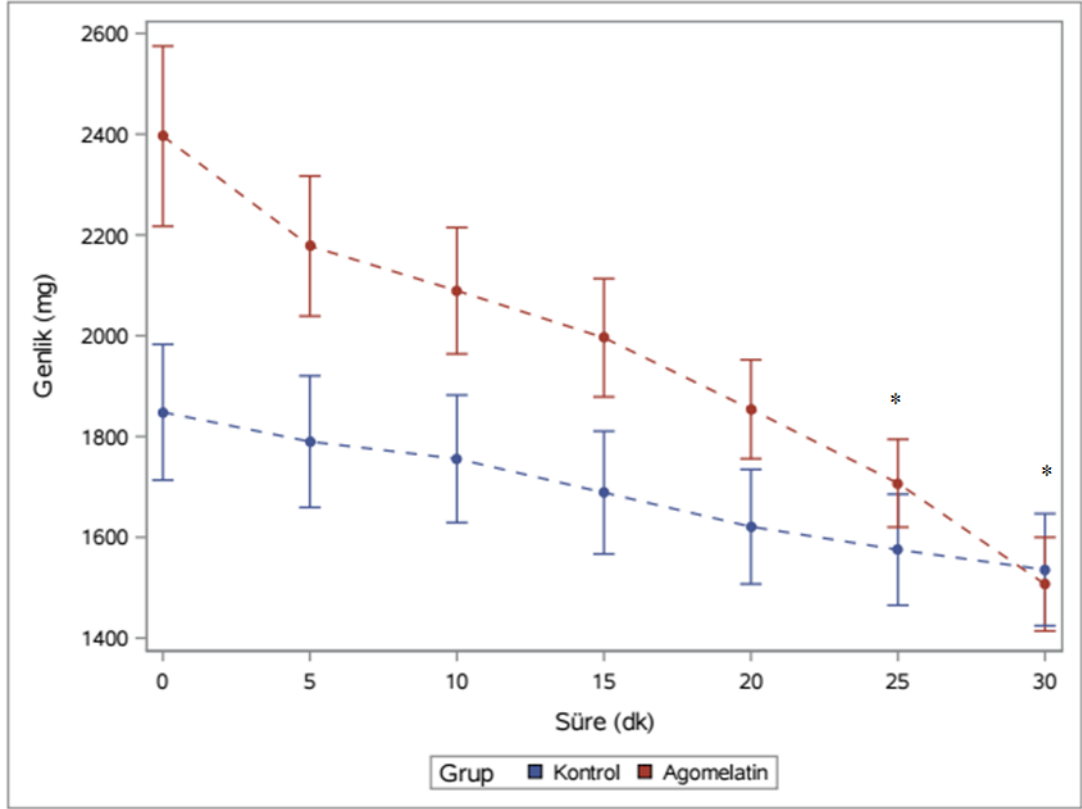
## 4. BULGULAR

Yapılan çalışmada Agomelatin, Melatonin ve 4PPDOT olmak üzere üç grup vardır.

### 4.1. Agomelatin Protokol Grubu Bulguları

Mesane şeritleri Krebs solüsyonu içeren organ banyosuna yerleştirildikten sonra, gerime bağlı olarak spontan kasılmalar oluştu. Bu kasılmalar belirli bir süre takip edildi. Daha sonra agomelatinin mesane kasılmaları üzerindeki olası etkisini belirlemek amacıyla  $10^{-3}$  M konsantrasyonda Agomelatin deneme amaçlı olarak hazneye uygulandı. Uygulamayı takiben kasılmaların genliğinde belirgin azalma ortaya çıktı. Aynı şartlarda tekrarlanan uygulama benzer sonuç gösterdi. Bu bulgular sonucunda agomelatinin mesane kasılmaları üzerinde baskılayıcı etkiye sahip olduğu görüldü.

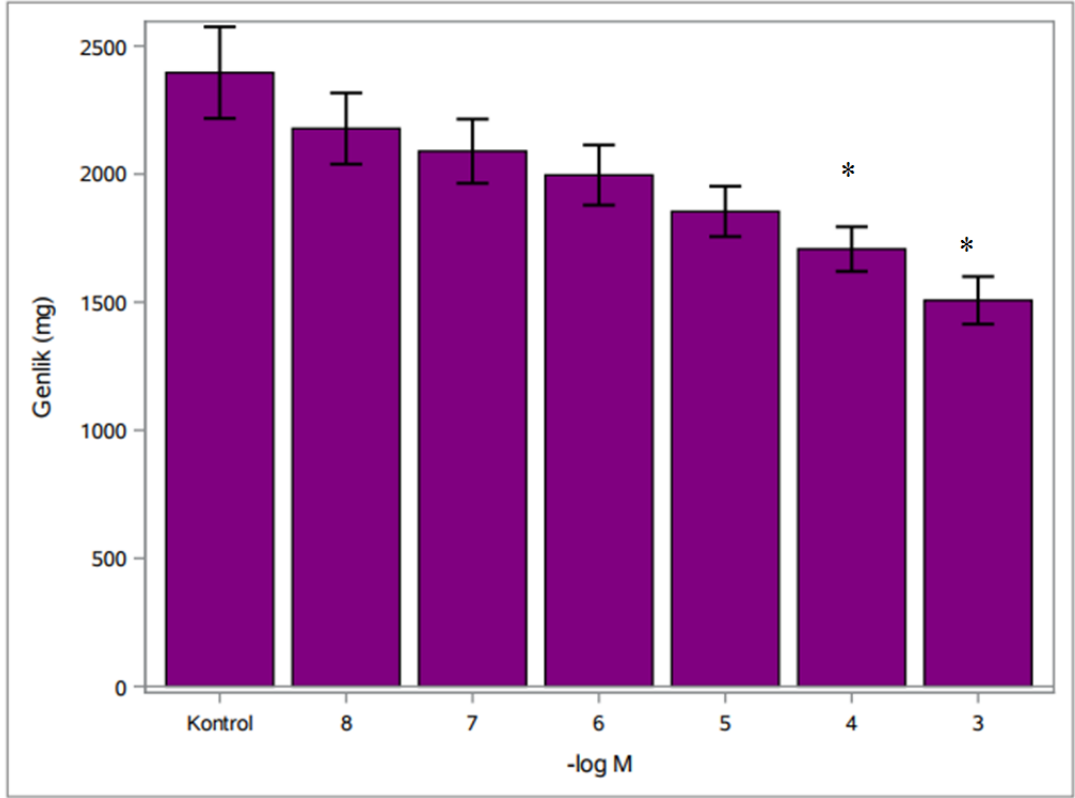
Tüm bu deneme çalışmalarından sonra esas teşkil eden protokoller uygulandı. Organ banyosu haznesine yerleştirildikten sonra 15 dakikada bir yıkama yapılarak yaklaşık olarak 45 dakikalık bir uyum periyodu sonrasında spontan olarak kasılan mesane stripleri  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi ile indüklendi. Kontrol grubunun genlik parametreleri kaydedildi. Kontrol grubunun (n=7) genlik parametreleri sırasıyla 1848.174±158.307; 1789.860±134.837; 1755.679±125.996; 1688.680±119.615; 1620.979±106.238; 1575.246±99.368; 1535.670±102.518 mg olarak belirlendi. Agomelatinin etki ettiği konsantrasyonu belirlemek için spontan olarak kasılan mesane stripleri  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi ile indüklendikten sonra beş dakika arayla ve sırasıyla hazneye  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M agomelatin kümülatif olarak ilave edildi. Oluşan etki kayıt altına alındı. Agomelatin grubunun (n=7) genlik parametresi ise 2396.049±158.307; 2177.959±134.837; 2089.370±125.996; 1996.040±119.615; 1854.039±106.238; 1707.223±99.368; 1506.999±102.518 mg şeklinde olup  $10^{-4}$  M ve  $10^{-3}$  M konsantrasyonlarında anlamlı bir inhibisyon ( $p<0.01$  ve  $p<0.001$  sırasıyla) gözlemlendi. Elde edilen bulgularla Agomelatinin mesane kasılmaları üzerinde baskılayıcı etkiye sahip olduğu görüldü (Şekil 4.1).



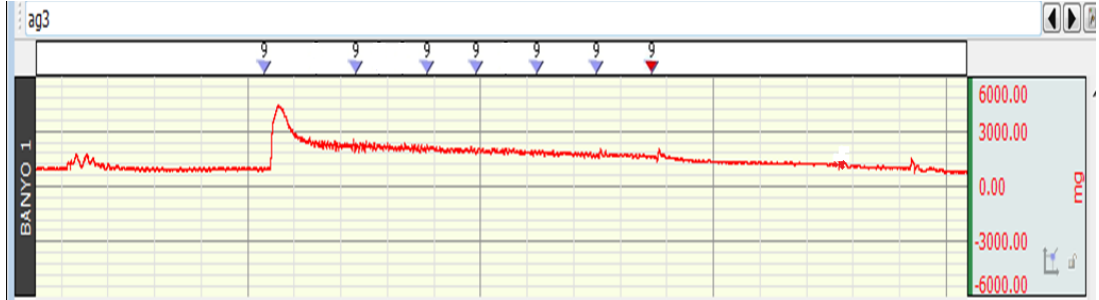
**Şekil 4.1.** Agomelatin protokol grubunda ACh ile indüklenmiş mesane kasılmalarının genlik üzerine etkisi (0:ACh ile indüklenme sonrası kasım spontan kasılması, Agomelatin grubunda sırasıyla  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M agomelatinin kümülatif olarak ilavesini göstermektedir, \* $p<0.01$  ve  $p<0.001$ ).

Gruplar	0 dk-25 dk	0 dk-30 dk
Kontrol	0.366	0.847
Agomelatin	<0.01*	<0.001*

**Tablo 4.1.** Agomelatin deney grubunda ikili p değerlerinin karşılaştırılması (\* $p<0.01$  ve  $p<0.001$ ).



**Şekil 4.2.** Agomelatin dozlarının ACh ile indüklenmiş mesane kasılmalarında genlik üzerine etkisi (\* $p < 0.01$  ve  $p < 0.001$ ).

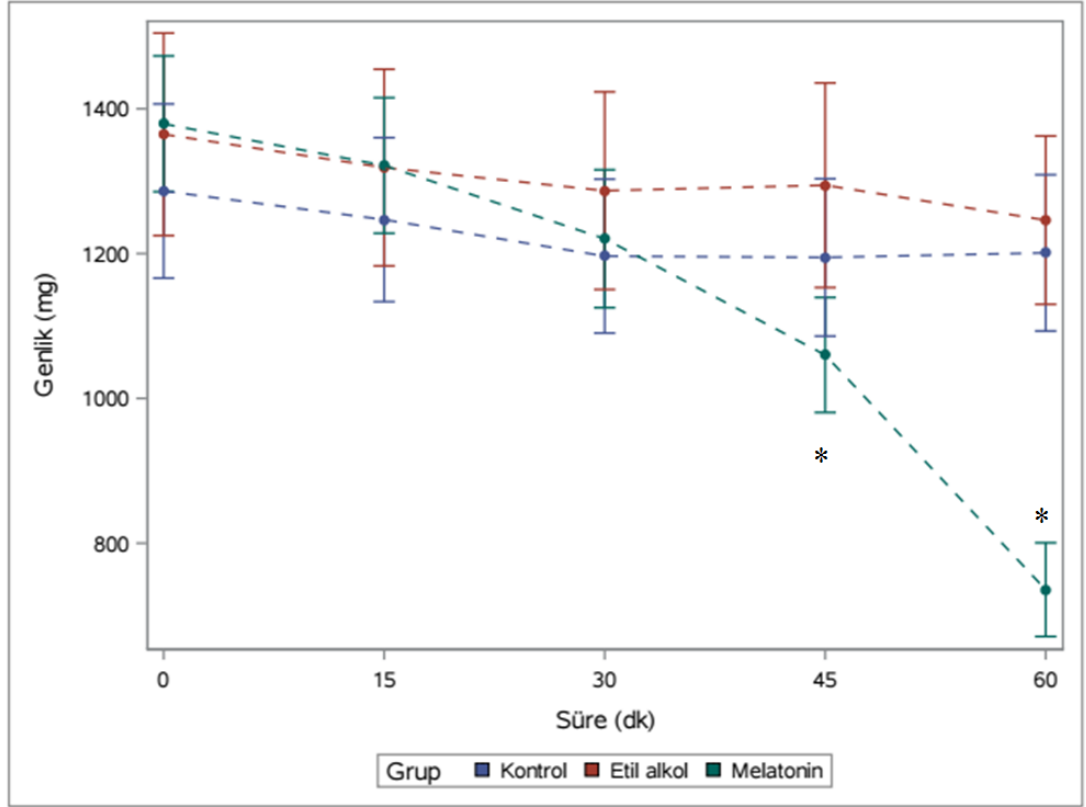


**Şekil 4.3.** Agomelatin dozlarının ACh ile indüklenmiş in vitro sıçan mesane düz kas kontraktilesi üzerine etkisini gösteren orijinal trase.

## 4.2. Melatonin Protokol Grubu Bulguları

Mesane şeritleri Krebs solüsyonu içeren organ banyosuna yerleştirildikten sonra, gerime bağlı olarak spontan kasılmalar oluştu. Bu kasılmalar belirli bir süre takip edildi. Daha sonra melatoninin mesane kasılmaları üzerindeki olası etkisini

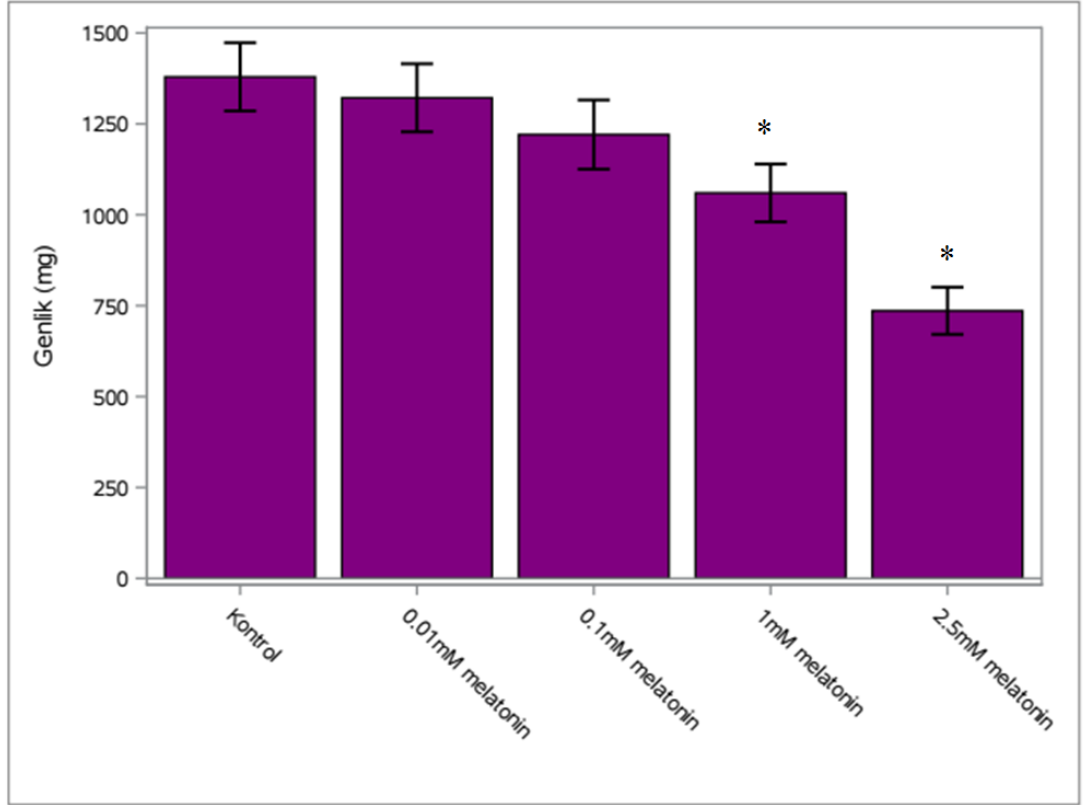
belirlemek amacıyla 2.5 mM konsantrasyonda melatonin deneme amaçlı olarak hazneye uygulandı. Uygulamayı takiben kasılmaların genliğinde belirgin azalma ortaya çıktı. Aynı şartlarda tekrarlanan uygulama benzer sonuç gösterdi. Bu bulgular sonucunda melatoninin mesane kasılmaları üzerinde baskılayıcı etkiye sahip olduğu görüldü. Tüm bu deneme çalışmalarından sonra esas teşkil eden protokoller uygulandı. Kontrol grubu (n=8) ve çözücü grubunun (n=8) genlik parametreleri sırasıyla 1286.33±120.24; 1246.84±113.22; 1196.49±106.29; 1194.67±108.69; 1200.96±107.89 ve 1364.66±139.85; 1318.77±135.82; 1286.85±136.42; 1294.35±141.26; 1246.16±116.22 mg olarak belirlendi. Son olarak, organ banyosu haznesine yerleştirildikten sonra 15 dakikada bir yıkama yapılarak yaklaşık olarak 45 dakikalık bir uyum periyodu sonrasında spontan olarak kasılan mesane stripleri  $10^{-5}$  M ACh çözeltisi ile indüklendi. Melatoninin etki ettiği konsantrasyonu belirlemek 20 dakika sonra ve 15 dakika arayla hazneye 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 2.5 mM melatonin kümülatif olarak ilave edildi. Melatonin grubunun (n=8) genlik parametresi ise 1379.18±93.74; 1321.65±93.60; 1220.47±95.21; 1059.95±79.40; 735.84±64.70 mg şeklinde olup 1 mM ve 2.5 mM konsantrasyonlarında anlamlı bir inhibisyon ( $p<0.001$ ) gözlemlendi. Elde edilen bulgularla melatoninin mesane kasılmaları üzerinde baskılayıcı etkiye sahip olduğu görüldü (Şekil 4.4).



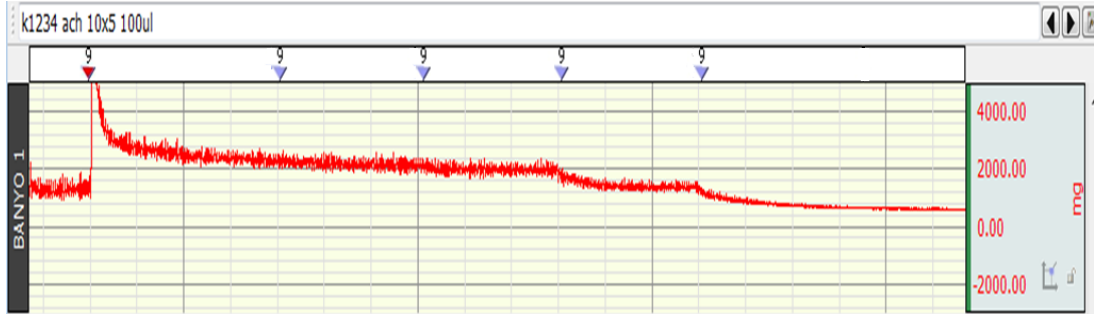
**Şekil 4.4.** Melatonin protokol grubunda ACh ile indüklenmiş mesane kasılmalarının genlik üzerine etkisi (0:ACh ile indüklenme sonrası kasın spontan kasılması, Etil Alkol grubunda sırasıyla 1, 10, 100, 250 µl Etil Alkolün kümülatif olarak ilave edilmesini, Melatonin grubunda ise 0.01, 0.1, 1 ve 2.5 mM Melatoninin kümülatif olarak ilavesini göstermektedir, \* $p < 0.001$ ).

Gruplar	0 dk-45 dk	0 dk-60 dk	30 dk-45 dk	30 dk-60 dk
Kontrol	0.007	0.009	1.000	1.000
Etil alkol	0.652	0.1770	1.000	0.933
Melatonin	<0.001*	<0.001*	0.007	<0.001*

**Tablo 4.2.** Melatonin deney grubunda ikili p değerlerinin karşılaştırılması (\* $p < 0.001$ )



Şekil 4.5. Melatonin dozlarının ACh ile indüklenmiş mesane kasılmalarında genlik üzerine etkisi (\* $p < 0.001$ ).

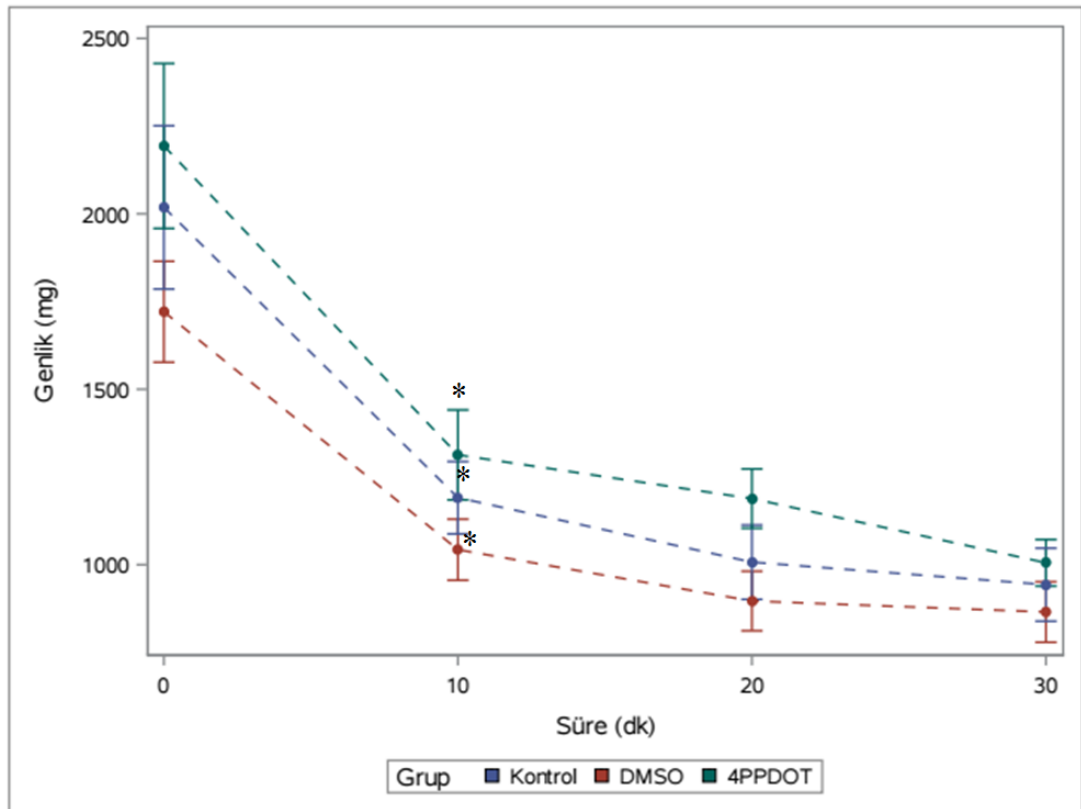


Şekil 4.6. Melatonin dozlarının ACh ile indüklenmiş in vitro sıçan mesane düz kas kontraktilesi üzerine etkisini gösteren orijinal trase.

### 4.3. 4P-PDOT Protokol Grubu Bulguları

Mesane şeritleri Krebs solüsyonu içeren organ banyosuna yerleştirildikten sonra, gerime bağlı olarak spontan kasılmalar oluştu. Bu kasılmalar belirli bir süre takip edildikten sonra esas teşkil eden protokoller uygulandı. Kontrol grubu (n=8) ve

çözücü grubunun (n=8) genlik parametreleri sırasıyla 2018.30±232.72; 1190.87±103.15; 1007.20±105.90; 943.05±104.01 ve 1720.86±143.79; 1042.75±87.00; 896.48±834.87; 865.19±86.25 mg olarak belirlendi. Son olarak, organ banyosu haznesine yerleştirildikten sonra 15 dakikada bir yıkama yapılarak yaklaşık olarak 45 dakikalık bir uyum periyodu sonrasında spontan olarak kasılan mesane stripleri  $10^{-5}$  M ACh ve 2mM Melatonin ile indüklendi. 4P-PDOT etkisini belirlemek için 10 dakika sonra 10 dakika arayla 0.01 mM, ve 0.1 mM 4PPDOT hazneye kümülatif olarak ilave edildi. 4P-PDOT grubunun (n=8) genlik parametresi ise 2193.47±235.08; 1312.83±128.21; 1188.35±84.50; 1005.33±66.28 mg şeklinde olup kontraksiyonlardaki anlamlı farklılık yalnızca her üç gruba 2mM melatonin ilave edildiğinde ( $p<0.001$ ) gözlemlendi. Elde edilen bulgularla 4P-PDOT'un melatonin ile indüklenmiş mesane kasılmaları üzerinde etkiye sahip olmadığı görüldü (Şekil 4.7).

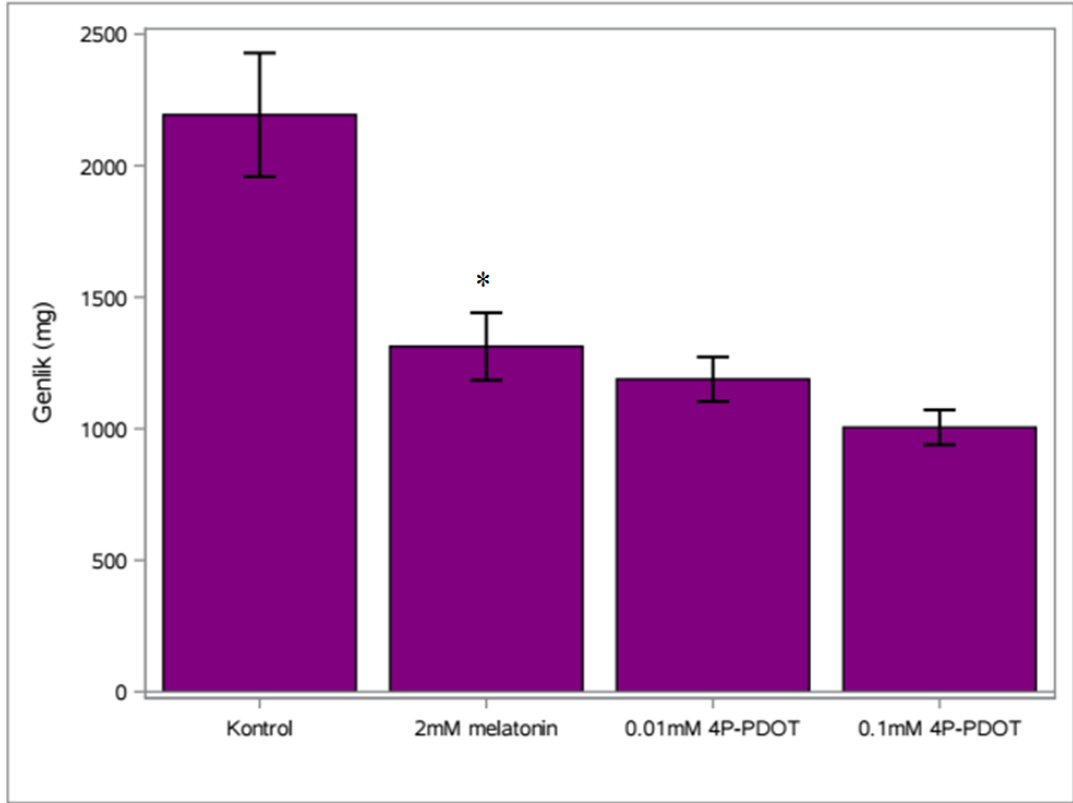


Şekil 4.7. 4P-PDOT protokol grubunda ACh ile indüklenmiş mesane kasılmalarının genlik üzerine etkisi (0:ACh ile indüklenme sonrası kasın spontan kasılması, 10: 2 mM Melatonin uygulanması, DMSO grubunda sırasıyla 0.8 ve 8 µl DMSO'nun kümülatif olarak ilave edilmesini, 4P-PDOT grubunda ise 0.01 ve 0.1 mM 4P-PDOT'un kümülatif olarak ilavesini göstermektedir, \* $p<0.001$ ).

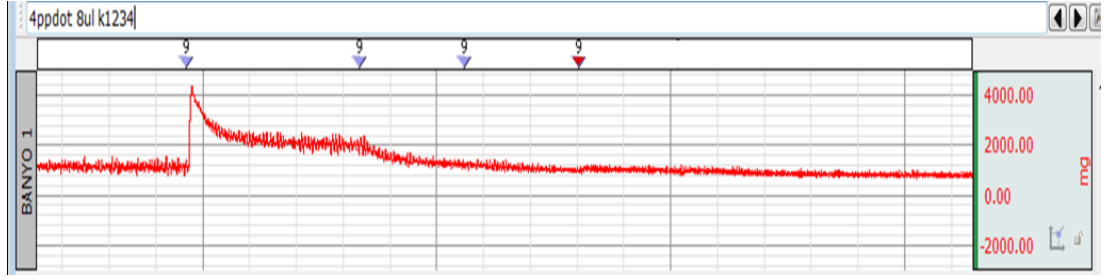


Gruplar	0 dk-20 dk	20 dk-30 dk	10 dk-30 dk
Kontrol	<0.001*	0.416	0.408
DMSO	<0.001*	0.002	0.009
Melatonin	<0.001*	0.630	0.072

**Tablo 4.3.** 4P-PDOT deney grubunda ikili p değerlerinin karşılaştırılması (\*p<0.001).



**Şekil 4.8.** 4P-PDOT dozlarının ACh ile indüklenmiş mesane kasılmalarında genlik üzerine etkisi (\*p<0.001).



**Şekil 4.9.** 4P-PDOT dozlarının ACh ile indüklenmiş in vitro sıçan mesane düz kas kontraktilitesi üzerine etkisini gösteren orijinal trase.



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaptığımız bu çalışmada, ACh ile indüklenen in vitro sıçan mesanesi düz kas kontraktilesi üzerine melatonin reseptör agonisti agomelatinile melatonin farklı dozlarının ve melatonin ile indüklenmiş mesane dokusuna 4P-PDOT antagonistinin farklı dozlarının yaptığı muhtemel etkileri ve bu etkilerin hangi mekanizma üzerinden olduğu araştırıldı.

Mesaneden idrar çıkışı sırasında parasempatik kolinerjik sinirlerden ve ürotelyum içinde bulunan non-nöronal hücrelerden, detrusor kasında bulunan muskarinik reseptör üzerindeki bazı bölgelerden ACh salınımı meydana gelmektedir. ACh salınımının sonucu olarak detrusor hücrelerinde güçlü kontraksiyonların oluştuğu ifade edilmiştir (Abrams ve ark. 2006). ACh salınımı, presinaptik sinir sonlanmasında bulunan  $M_1$  reseptörlerinin uyarılmasıyla artarken,  $M_2$  ve  $M_4$  reseptörlerinin uyarılmasıyla azalmaktadır (Chess-Williams 2002). ACh'ın salınımına aynı zamanda ürotelyumun gerilmesi de yol açmaktadır. Mesanenin dolması sırasında ürotelyum belirli bir gerime ulaştığı zaman salınan ACh üriyasyon kontraksiyonlarını başlatmaktadır. ACh,  $M_3$  reseptörlerine bağlandığında aktive olan PLC,  $IP_3$  oluşumuna neden olur.  $IP_3$  ise SR'den  $Ca^{+2}$ 'un salınmasına yol açarak CaM'in korformasyonel değişime uğramasına neden olur. Bu değişiklik sonrası detrusor kasında kasılma meydana gelmektedir. Ayrıca ACh  $M_3$  reseptörlerine bağlandığında zaman, voltaja duyarlı voltaja duyarlı L tipi  $Ca^{+2}$  kanallarından sarkolemmaya  $Ca^{+2}$  girişini artırır. Böylelikle mesane düz kasının kasılmasına yol açar (Andersson ve Wein 2004).

Sonuç olarak melatonin cAMP ile cGMP'nin hücre içine birikmesini inhibe eder (Vanecek ve Klein 1995; Vanecek 1998). Bununla beraber melatonin, AC'nin farmakolojik aktivatörü olarak bilinen ve cAMP birikimini uyarın forskolin'i inhibe eder (Carlos ve ark. 1989; Gall ve ark. 2002; Morgan ve ark. 1989; Vanecek ve Vollrath 1989). Ayrıca hem intraselüler  $Ca^{+2}$  salınımını hemde içeriye doğru olan  $Ca^{+2}$  akışını inhibe ederek intraselüler  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonunu düşürmektedir (Vanecek ve Klein 1995; Vanecek 1998). Bu tez çalışmasının bulgularında da melatonin ve agomelatinin in vitro mesane düz kas kontraksiyonlarını belirgin olarak azalttığını göstermektedir. Ayrıca melatoninin ACh etkisini inhibe ettiği çeşitli deneysel çalışmalarda bildirilmiştir (Garcia-Colunga ve Miledi 1996).

Velerda ve ark. (2009) farklı dozlarda ACh-indüklenmiş izole goldfish barsaklarında melatonin farklı dozları ile yaptıkları çalışmada 1nM ve üzerinin kontraksiyonlara inhibe edici etkisi olduğunu göstermektedir. Melatonin ile indüklenen in vitro barsak şeritleri luzindol ve 4P-PDOT ile muamele edilmiştir. Çalışmanın sonucunda 10 nmol luzindol ve 1 nmol 4P-PDOT ve üzeri dozların melatonin ile inhibisyonu anlamlı şekilde geri çevirdiğini ileri sürmektedir. Ortaya çıkan antagonist etkinin yüksek hücre içi ve dışı  $Ca^{+2}$  konsantrasyon seviyelerinde görülmesi  $Ca^{+2}$  seviyesinin önemini göstermektedir.

Ahmed ve ark. (2013) tarafından sıçan gastrointestinal kas dokusuyla yapılan çalışmada melatonin ile indüklenen kasılmaseçici olmayan MT1/MT2 antagonisti luzindol (1 uM) tarafından engellenmiştir, ancak seçici MT2 antagonisti 4P-PDOT (100 nM) tarafından ve PLC inhibitörü U73122 tarafından engellenmemiştir.

Bu tez çalışmasının bulguları agomelatinin in vitro mesane düz kas kontraksiyonları üzerinde özellikle  $10^{-4}$  M ve  $10^{-3}$  M konsantrasyonlarında anlamlı bir ( $p < 0.01$  ve  $p < 0.001$ , sırasıyla) inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Melatonin ise 1 mM ve 2.5 mM konsantrasyonlarında anlamlı bir inhibisyona ( $p < 0.001$ ) yol açmıştır. 2mM Melatonin ile indüklenen 0.01 mM, ve 0.1 mM 4P-PDOT'un melatonin ile indüklenmiş mesane kasılmaları üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak çalışmamızda; melatonin ve agomelatin in vitro sıçan mesane düz kas kontraksiyonları üzerinde belirgin inhibitör etki göstermektedir ve MT2 seçici reseptör antagonisti olan 4P-PDOT melatonin ile indüklenen kasılmalar üzerinde anlamlı bir etki yapmamıştır. Çalışmamız sonunda ortaya çıkan veriler melatoninin in vitro sıçan mesane kasılması üzerine MT1 aracılığıyla etki edebileceği ihtimalini kuvvetlendirmektedir.

Çalışmış olduğumuz kimyasal ajanların fizyolojik etkilerinin daha iyi ortaya konması ve etkinliklerinin net bir şekilde gösterilebilmesi için daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 6. KAYNAKLAR

Ahmed R, Mahavadi S, Al-Shboul O, Bhattacharya S, Grider JR, Karnam S. Murthy. Characterization of signaling pathways coupled to melatonin receptors in gastrointestinal smooth muscle. *Regul Pept.* 2013; 184: 96–103.

Albert AP and Large WA. Store-operated  $Ca^{2+}$ -permeable nonselective cation channels in smooth muscle cells. *Cell Calcium.* 2003; 33: 345–356.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* Garland Publishing Inc. 2002; 852-862.

Amberg GC, Bonev AD, Rossow CF, Nelson MT, Santana LF, Modulation of the molecular composition of large conductance,  $Ca^{2+}$  activated  $K^{+}$  channels in vascular smooth muscle during hypertension. *J. Clin. Invest.* 2003; 112:717–724.

Andersson KE. Clinical pharmacology of potassium channel openers. *Pharmacol Toxicol.* 1992; 70: 244–254.

Andersson KE. Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. *Pharmacol Rev.* 1993; 45: 253–308

Asada Y, Yamazawa T, Hirose K, Takasaka T, Iino M. Dynamic  $Ca^{2+}$  signalling in rat arterial smooth muscle cells under the control of local renin-angiotensin system. *J. Physiol. Lond.* 1999; 521: 497–505.

Asada Y, Yamazawa T, Hirose K, Takasaka T, Iino M. Dynamic  $Ca^{2+}$  signalling in rat arterial smooth muscle cells under the control of local renin-angiotensin system. *J. Physiol. Lond.* 1999; 521: 497–505.

Austin C, Wray S. The effects of extracellular pH and calcium change on force and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. *J. Physiol. Lond.* 1995; 488: 281–291.

Ayar A, Kutlu S, Yılmaz B, Keleştimur H. Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium in vitro. *Neuroendocrinology Letters.* 2001; 22: 199-207.

Bayguinov O, Hagen B, Bonev AD, Nelson MT, Sanders KM. Intracellular calcium events activated by ATP in murine colonic myocytes. *Am. J. Physiol.* 2000; 279: C126–C135.

Benham CD, Bolton TB. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. *J. Physiol. Lond.* 1986; 381: 385–406.

Berne M, Levy ML. *Berne&Levy physiology.* Elsevier. 2017. seventh edition. Philadelphia.

Berridge MJ. Inositol Trisphosphate and Calcium Signalling. *Nature.* 1993; 361: 315.

Bodinat C, Guardiola-Lemaitre B, Mocaer E, Renard P, Munoz C, Millan MJ. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nature reviews Drug discovery.* 2010; 9: 628-42.

Boittin FX, Coussin F, Morel JL, Halet G, Macrez N, Mironneau J.  $Ca^{2+}$  signals mediated by  $Ins(1,4,5)P_3$ -gated channels in rat ureteric myocytes. *Biochem. J.* 2000; 349: 323–332.

Boittin FX, Macrez N, Halet G, Mironneau J. Norepinephrine-induced  $Ca^{2+}$  waves depend on InsP3 and ryanodine receptor activation in vascular myocytes. *Am. J. Physiol.* 1999; 277: C139–C151.

Bonev AD, Jagger JH, Rubart M, Nelson MT. Activators of protein kinase C decrease  $Ca^{2+}$  spark frequency in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: C2090–C2095.

Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW. Vasoregulation by the B1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature.* 2000; 407: 870–876.

Brooks SV. Current topics for teaching skeletal muscle physiology. *Adv Physiol Educ.* 2003; 27: 171.

Burdyga FV, Babich LF, Taran TT, Kosterin SA. The calcium pump in the sarcolemma controls smooth muscle relaxation. *Biofizika.* 1994; 39(2): 365-71.

Burdyga TV, Taggart MJ, Crichton CA, Smith GI, Wray S. The mechanism of  $Ca^{2+}$  release from the SR of permeabilized guinea-pig and rat ureteric smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1997; 435: 182-184.

Burdyga TV, Taggart MJ, Wray S. Major difference between rat and guinea-pig ureter in the ability of agonists and caffeine to release  $Ca^{2+}$  and influence force. *J. Physiol. Lond.* 1995; 489: 327–335.

Burdyga TV, Wray S. SR function and contractile consequences in ureteric smooth muscles. What is the role of the SR in smooth muscle. Wiley Press for the Novartis Foundation. 2002; 208–220.

Burdyga TV, Wray S. The effect of cyclopiazonic acid on excitation–contraction coupling in guinea-pig ureteric smooth muscle: role of the SR. *J. Physiol. Lond.* 1999; 517: 855–865.

Carlberg C. Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 917: 387-96.

Cernecka H, Kersten K, Maarsingh H, Elzinga CR, de Jong IJ, Korstanje C.  $\beta_3$ -Adrenoceptor-mediated relaxation of rat and human urinary bladder: roles of BKCa channels and rho kinase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2015; 386: 749–59.

Chambers P, Neal DE, and Gillespie JI.  $Ca^{2+}$  mobilization in cultured human bladder smooth muscle cells in response to hypotonic stimuli. *Exp Physiol.* 1997; 82: 677–686.

Chaste P, Clement N, Botros HG. Genetic variations of the melatonin pathway in patients with attention-deficit and hyperactivity disorders. *J Pineal Res.* 2011; 51: 394-9.

Chaste P, Clement N, Mercati O. Identification of pathway-biased and deleterious melatonin receptor mutants in autism spectrum disorders and in the general population. *PLoS One.* 2010; 5: e11495.

Chen MX, Gorman SA, Benson B. Small and intermediate conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels confer distinctive patterns of distribution in human tissues and differential cellular localisation in the colon and corpus cavernosum, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2004; 369: 602–615.

Chen Q, Yu P, Petris G, Biancani P, Behar J. Distinct muscarinic receptors and signal transduction pathways in gallbladder muscle. 1995; 273(2): 650-5.

Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle, *Science*. 1993; 262: 740–744.

Comai S, Gobbi G. Unveiling the role of melatonin MT2 receptors in sleep, anxiety and other neuropsychiatric diseases: a novel target in psychopharmacology. *J Psychiatry Neurosci*. 2014; 39: 6-21.

Coussin F, Macrez N, Morel JL, Mironneau J. Requirement of ryanodine receptor subtypes 1 and 2 for Ca(2+)-induced Ca(2+) release in vascular myocytes. *J. Biol. Chem*. 2000; 275: 9596–9603.

Cox DH, Aldrich RW. Role of the beta1 subunit in large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel gating energetics. Mechanisms of enhanced Ca(2+) sensitivity. *J. Gen. Physiol*. 2000; 116: 411–432.

Craven M, Sergeant GP, Hollywood MA, McHale NG, Thornbury KD. Modulation of spontaneous Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> currents in the rabbit corpus cavernosum by the nitric oxide-cGMP pathway. *J. Physiol*. 2004; 556: 495–506.

Criddle DN, de Moura RS, Greenwood IA, Large WA. Effect of niflumic acid on noradrenaline-induced contractions of the rat aorta. *Br. J. Pharmacol*. 1996; 118: 1065–1071.

Davies AM, Batchelor TJ, Eardley I, Beech DJ. Potassium channel KV alpha1 subunit expression and function in human detrusor muscle. *J Urol*. 2002; 167: 1881–1886.

Du W, Stiber JA, Paul RB, Gerhard M, Eu JP. Ryanodine receptors in muscarinic receptor-mediated bronchoconstriction, *J. Biol. Chem*. 2005;280(28) :26287-94.

Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci*. 2003; 8: d1093-1108.

Dubocovich, M.L. Drug evaluation: agomelatine targets a range of major depressive disorder symptoms. *Curr. Opin. Invest. Drugs*. 2006;.7: 670–680.

Dufourny L, Levasseur A, Migaud M. GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evol Biol*. 2008; 8: 105.

Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed Pharmacother*. 2006; 60: 97-108.

Evans RJ, Lewis C, Virginio C, Lundstrom K, Buell G, Surprenant A, North RA. Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol*. 1996;497: 413–422.

Fernandez-Fernandez JM, Tomas M, Vazquez E. Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension, *J. Clin. Invest*. 2004; 113: 1032–1039.

Ferry G, Hecht S, Berger S. Old and new inhibitors of quinone reductase 2. *Chem Biol Interact*. 2010; 186: 103-9.

Fomin V P, Cox B E, Word R A. Effect of progesterone on intracellular  $Ca^{++}$  homeostasis in human myometriyal smooth muscle cells. *Am J Physiology*. 1999; 276: C379- 385.

Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Stone TW, Darlington LG. Inflammatory status and kynurenine metabolism in rheumatoid arthritis treated with melatonin. *Br J Clin Pharmacol*. 2007; 64: 517-26.

Fovaeus M, Andersson KE, Batra S, Morgan E, and Sjogren C. Effects of calcium, calcium channel blockers and Bay K 8644 on contractions induced by muscarinic receptor stimulation of isolated bladder muscle from rabbit and man. *J Urol*. 1987; 137: 798–803,

Fox S. *Human Physiology:McGraw-HillEducation*, 2016, 14th edition, United States.

Fry CH, Wu C, Sui GP. Electrophysiological properties of the bladder. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*.1998; 9: 291–298.

Fung Y. *Biomechanics Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues*, Springer. 1993. 2nd ed. U.S.A.

Ganitkevich VY, Isenberg G. Contribution of  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release to the  $[Ca^{2+}]_i$  transients in myocytes from guinea-pig urinary bladder. *J Physiol*. 1992; 458: 119–137.

Ganong WF. *Review of medical physiology*. McGraw-Hill Medical Pub. Division, 2011; 23rd edition. New York,

Gerthoffer WT. Signal-transduction pathways that regulate visceral smooth muscle function. III. Coupling of muscarinic receptors to signaling kinases and effector proteins in gastrointestinal smooth muscles, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2005; 288: G849–G853.

Godson C, Reppert SM. The  $Mel_{1a}$  melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology*. 1997; 138: 397–404.

Gordienko DV, Bolton TB, Cannell MB. Variability in spontaneous subcellular calcium release in guinea-pig ileum smooth muscle cells. *J. Physiol*. 1998; 507: 707–720.

Gordienko DV, Bolton TB. Crosstalk between ryanodine receptors and IP3 receptors as a factor shaping spontaneous  $Ca^{2+}$ -release events in rabbit portal vein myocytes. *J. Physiol. Lond*. 2002; 542: 743–762.

Gordienko DV, Bolton TB. Crosstalk between ryanodine receptors and IP3 receptors as a factor shaping spontaneous  $Ca^{2+}$ -release events in rabbit portal vein myocytes. *J. Physiol. Lond*. 2002; 542: 743–762.

Gordienko DV, Greenwood IA, Bolton TB. Direct visualization of sarcoplasmic reticulum regions discharging  $Ca^{2+}$  sparks in vascular myocytes. *Cell Calcium*. 2001; 29: 13–28.

Grant TL, Zuzack JS. Effects of K channel blockers and cromakalim (BRL 34915) on the mechanical activity of guinea pig detrusor smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991; 259: 1158–1164.

Greenwood IA, Large WA. Analysis of the time course of calcium-activated chloride “tail” currents in rabbit portal vein smooth muscle cells,. *Pflugers. Arch*. 1996; 432: 970–979.



Gubitza AK, Reppert SM. Assignment of the melatonin-related receptor to human chromosome X (GPR50) and mouse chromosome X (Gpr50). *Genomics*. 1999; 55: 248-51.

Guyton AC. *Textbook of medical physiology*. Elsevier. 2006. 11th ed. Philadelphia.

Hardeland R. Melatonin in aging and disease -multiple consequences of reduced secretion, options and limits of treatment. *Aging Dis*. 2012; 3: 194-225.

Hardeland R. New approaches in the management of insomnia: weighing the advantages of prolonged-release melatonin and synthetic melatonergic agonists. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2009; 5: 341-54.

Hashitani H, Bramich NJ, Hirst GD. Mechanisms of excitatory neuromuscular transmission in the guinea-pig urinary bladder. *J Physiol*. 2000; 524: 565-579.

Hashitani H, Fukuta H, Takano H, Klemm MF, Suzuki H. Origin and propagation of spontaneous excitation in smooth muscle of the guinea-pig urinary bladder. *J Physiol*. 2001; 530: 273-286.

Hayashi M, Kajioka S, Itsumi M. Actions of cyclic 3050-adenosine monophosphate (cAMP) on calcium sensitisation in human detrusor smooth muscle contraction. *BJU Int*. 2015; 117: 179-91.

Helm-van Mil AH, van Someren EJ, van den Boom R. No influence of melatonin on cerebral blood flow in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 5989-94.

Heppner TJ, Bonev AD, Nelson MT. Elementary purinergic Ca<sup>2+</sup> transients evoked by nerve stimulation in rat urinary bladder smooth muscle. *J Physiol*. 2005; 564: 201-212.

Herrera GM, Heppner TJ, Nelson MT. Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2000; 279: R60-R68.

Herrera GM, Heppner TJ, Nelson MT. Voltage dependence of the coupling of Ca<sup>2+</sup> sparks to BK(Ca) channels in urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280: C481-C490.

Herrera GM, Nelson MT. Differential regulation of SK and BK channels by Ca<sup>2+</sup> signals from Ca<sup>2+</sup> channels and ryanodine receptors in guinea-pig urinary bladder myocytes. *J Physiol*. 2002; 541: 483-492.

Heuvel CJ, Kennaway DJ, Dawson D. Thermoregulatory and soporific effects of very low dose melatonin injection. *Am J Physiol*. 1999; 276: E249-54.

Hirsch-Rodriguez E, Imbesi M, Manev R, Uz T, Manev H. The pattern of melatonin receptor expression in the brain may influence antidepressant treatment. *Med Hypotheses*. 2007; 69: 120-4.

Huizinga JD. Intercellular Communication in Smooth Muscle. *Experientia* 1992; 48: 932.

Inoue R, Brading AF. Human, pig and guinea-pig bladder smooth muscle cells generate similar inward currents in response to purinoceptor activation. *Br J Pharmacol*. 1991; 103: 1840-1841.

Jaggard JH, Lederer WJ, Nelson MT. Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000; 278(2): 235-56.

Janiak R, Wilson SM, Montague S, Hume JR. Heterogeneity of calcium stores and elementary release events in canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 2001; 280: C22–C33.

Janssen LJ, Simms SM. Spontaneous transient inward currents in rhythmicity in canine and guinea-pig tracheal smooth muscle cells. *Pflugers. Arch.* 1994; 427: 473–480.

Janssen LJ, Sims SM. Acetylcholine activates non-selective cation and chloride conductances in canine and guinea-pig tracheal myocytes. *J. Physiol.* 1992; 453: 197–218.

Ji G, Feldman ME, Greene KS, Sorrentino V, Xin HB, Kotlikoff MI. RYR2 proteins contribute to the formation of Ca(2+) sparks in smooth muscle, *J. Gen. Physiol.* 2004; 123: 377–386.

Jones K, Shmygol A, Kupittayanant S, Wray S. Electrophysiological characterization and functional importance of calciumactivated chloride channel in rat uterine myocytes. *Pflugers. Arch.* 2004; 448(1): 36-43.

Joseph AH, Anna PM. Hypolite and Malykhina, *BMC Urology.* 2015; 5: 110.

Kajioka S, Nakayama S, McMurray G, Abe K, Brading AF. Ca(2) channel properties in smooth muscle cells of the urinary bladder from pig and human. *Eur J Pharmacol.* 2002; 443: 19–29

Karaki H. Calcium Movements, Distribution and Functions in Smooth muscle. *Pharmacol Review.* 1997; 49: 157.

Karicheti V, Christ GJ. Physiological roles for K channel and gap junctions in urogenital smooth muscle: implications for improved understanding of urogenital function, disease and therapy. *Curr Drug Targets.* 2001; 2: 1–20.

Kong ID, Koh SD, Sanders KM. Purinergic activation of spontaneous transient outward currents in guinea pig taenia colonic myocytes. *AJP Cell Physiol.* 2000; 278: C352–C362.

Krauchi K, Cajochen C, Wirz-Justice A. A relationship between heat loss and sleepiness: effects of postural change and melatonin administration. *J Appl Physiol.* 1997; 83: 134-9.

Kuriyama H, Inoue R, Itoh T. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. *Physiol Rev.* 1998; 78(3): 811-920.

Lee CH, Kuo KH, Poburko D. Ca(2+) oscillations, gradients, and homeostasis in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282(5): 1571-83.

Levoye A, Dam J, Ayoub MA. The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J.* 2006; 25: 3012-23.

Li DY, Smith DG, Hardeland R. Melatonin receptor genes in vertebrates. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 11208-23.

Lincoln TM, Conwell TL. Towards an Understanding of The Mechanism of Action of Cyclic AMP and Cyclic GMP in Smooth Muscle Relaxed. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94: 7655.

Lohn M, Jessner W, Furstenu M. Regulation of calcium sparks and spontaneous transient outward currents by RyR3 in arterial vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 2001; 89: 1051–1057.

Martin C, Hyvelin JM, Chapman KE, Marthan R, Ashley RH, Savineau JP. Pregnant rat myometrial cells show heterogeneous ryanodine- and caffeine-sensitive calcium stores. *Am. J. Physiol.* 1999; 46: C243–C252.

Martin C, Hyvelin JM, Chapman KE, Marthan R, Ashley RH, Savineau JP. Pregnant rat myometrial cells show heterogeneous ryanodine- and caffeine-sensitive calcium stores. *Am. J. Physiol.* 1999; 46: C243–C252.

Mazzone J, Buxton IL. Changes in small conductance potassium channel expression in human myometrium during pregnancy measured by RT-PCR, *Proc. West Pharmacol. Soc.* 2003; 46: 74–77.

Michel CM. Cellular basis of detrusor smooth muscle contraction. *BJU International.* 2016; 117: 177-178.

Millan MJ, Gobert A, Lejeune F. The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 306: 954-64.

Miriel V. Local and cellular Ca<sup>2+</sup> transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation. *J physiol.* 1999; 518: 815-24.

Miriel VA, Mauban JRH, Blaustein MP, Wier WG. Local and cellular Ca<sup>2+</sup> transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation. *J. Physiol. Lond.* 1999; 518: 815–824.

Mironneau J, Macrez N, Morel JL, Sorrentino V, Mironneau C. Identification and function of ryanodine receptor subtype 3 in non-pregnant mouse myometrial cells. *J. Physiol.* 2002; 538: 707–716.

Mironneau J, Macrez N, Morel JL, Sorrentino V, Mironneau C. Identification and function of ryanodine receptor subtype 3 in non-pregnant mouse myometrial cells. *J. Physiol.* 2002; 538: 707–716.

Missiaen L. Calcium ion homeostasis in smooth muscle. *Pharmacol ther.* 1992; 56: 191.

Montejo, AL, Prieto N, Terleira A, Matlas J, Alonso S, Paniagua G, Naval S, Parra DG, Gabriel C, Mocaer E, Portoles A. Better sexual acceptability of agomelatine (825 and 50 mg compared with paroxetine 20 mg) in 9 healthy male volunteers. An 8-week, placebo-controlled study using the PRSEXDQSALSEX scale. *J. Psychopharmacol.* 2010; 24, 111–120.

Montgomery BS, Fry CH. The action potential and net membrane currents in isolated human detrusor smooth muscle cells. *J Urol.* 1992; 147: 176–184.

Morgan JM, de Smedt H, Gillespie JI. Identification of three isoforms of the InsP<sub>3</sub> receptor in human myometrial smooth muscle, *Pflugers. Arch.* 1996; 431: 697–705.

Morgan JM, Smedt H, Gillespie JI. Identification of three isoforms of the InsP<sub>3</sub> receptor in human myometrial smooth muscle. *Pflugers. Arch.* 1996; 431: 697–705.

Mostwin JL. The action potential of guinea pig bladder smooth muscle. *J Urol.* 1986; 135: 1299–1303.

Motta P. Ultrastructure of smooth muscle. Ianchaster, england, Kluwer Academic. 1990.

Murphy RA. What is special about smooth muscle? The significance of covalent crossbridge regulation. *FASEB J.* 1994; 8: 311.

Nelson MT, Cheng H, Rubart M. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science.* 1995; 270: 633–637.

Nelson MT, Cheng H, Rubart M. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science.* 1995; 270: 633–7.

Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1995; 268: C799–C822.

Olie JP, Kasper S. Efficacy of agomelatine, a MT1/MT2 receptor agonist with 5-HT<sub>2C</sub> antagonistic properties in major depressive disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2007; 10, 661–673.

Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle. *Physiol Rev.* 1995; 75: 487.

Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol.* 2008; 85: 335-53.

Papp M, Gruca P, Boyer PA, Mocaer E. Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat. *Neuropsychopharmacology.* 2003; 28, 694–703.

Petkov GV, Heppner TJ, Bonev AD, Herrera GM, Nelson MT. Low levels of K(ATP) channel activation decrease excitability and contractility of urinary bladder. *Am J Physiol Regul Integr.* 2001;280(5): R1427-33.

Pluger S, Faulhaber J, Furstenau M. Mice with disrupted BK channel beta1 subunit gene feature abnormal Ca<sup>2+</sup> spark/STOC coupling and elevated blood pressure. *Circ. Res.* 2000; 87: 53–E60.

Porter VA, Bonev AD, Knot HJ. Frequency modulation of Ca<sup>2+</sup> sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: C1346–C1355.

Putney JW. Channeling calcium. *Cell Biology.* 2001; 410: 648.

Rada JA, Wiechmann AF. Melatonin receptors in chick ocular tissues: implications for a role of melatonin in ocular growth regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 25-33.

Raeymaekers L, Wuytack F. Ca<sup>2+</sup> pumps in smooth muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil.* 1993; 14: 141.

Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005; 288: C769–C783.

Sanders KM, Koh SD, Ördög T. A Novel Pacemaker Mechanism Drives Gastrointestinal Rhythmicity. *News Physiol Sci.* 2000; 15: 291-298.

Sergeant GP, Hollywood MA, McCloskey KD, McHale NG, Thornbury KD. Role of IP(3) in modulation of spontaneous activity in pacemaker cells of rabbit urethra. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001; 280: C1349–C1356.

Shabir S, Borisova L, Wray S, Burdyga T. Rho-kinase inhibition and electromechanical coupling in phasic smooth muscle; Ca<sup>2+</sup>-dependent and independent mechanisms. *J. Physiol.* 2004; 560: 839–855.

Shmygol A, Wray S. Functional architecture of the SR calcium store in uterine smooth muscle, *Cell Calcium.* 2004; 35: 501–508.

Sieck GC, Kannan MS, Prakash YS. Heterogeneity in dynamic regulation of intracellular calcium in airway smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1997; 75: 878–888.

Somlyo AP, Somlyo AV. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin. II. Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.* 2003; 83: 1325–1358.

Somylo AP, Somylo AV. Signal Transduction And Regulation in Smooth Muscle. *Nature.* 1994; 372: 231.

Sugden D, Yeh LK, Teh MT. Design of subtype selective melatonin receptor agonists and antagonists. *Reprod Nutr Dev.* 1999; 39: 335–344.

Suzuki K, Ito KM, Minayoshi Y, Suzuki H, Asano M, Ito K. Modification by charybdotoxin and apamin of spontaneous electrical and mechanical activity of the circular smooth muscle of the guinea-pig stomach. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 109: 661–666.

Swillens S, Dupont G, Combettes L, Champeil P. From calcium blips to calcium puffs: theoretical analysis of the requirements for interchannel communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96: 13750–13755.

Taggart MJ, Burdyga T, Heaton RC, Wray S. Stimulusdependent modulation of smooth muscle intracellular calcium and force by altered intracellular pH. *Pflugers. Arch.* 1996; 432: 803-811.

Taggart MJ, Wray S. Contribution of sarcoplasmic reticular calcium to smooth muscle contractile activation: gestational dependence in isolated rat uterus. *J. Physiol. Lond.* 1998; 511: 133-144.

Tertyshnikova S, Matson JA, Thalody G, Lodge NJ. Partially purified Grammostola spatulata venom inhibits stretch activated calcium signaling in bladder myocytes and improves bladder compliance in an in vitro rat whole bladder model. *J Urol.* 2003;169: 756–760.

Thorneloe KS, Nelson MT. Properties and molecular basis of the mouse urinary bladder voltage-gated K current. *J Physiol.* 2003; 549: 65–74.

Tovey SC, Smet P, Lipp P. Calcium puffs are generic InsP<sub>3</sub>-activated elementary calcium signals and are downregulated by prolonged hormonal stimulation to inhibit cellular calcium responses. *J. Cell Sci.* 2001; 114: 3979–3989.

Uchida W, Masuda N, Shirai Y, Shibasaki K, Satoh N, Takenada T. The role of extracellular Ca<sup>2+</sup> in carbachol-induced tonic contraction of the pig detrusor smooth muscle. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1994; 350: 398–402.

Uz T, Arslan AD, Kurtuncu M. The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT<sub>1</sub> in the central dopaminergic system. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005; 136: 45-53.

Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS. *Human Physiology.* McGraw-Hill. New York. 2010.

Velarde E, Luis A, Azpeleta A, Isorna E. Melatonin attenuates the acetylcholine-induced contraction in isolated intestine of a teleost. *Wsh. J Comp Physiol B*. 2009; 179: 951–959.

Visser AJ, van Mastrigt R. Intracellular electrical activity in human urinary bladder smooth muscle: the effect of high sucrose medium. *Urol Int*. 2001; 66: 205–211.

White C, McGeown JG. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors modulate Ca<sup>2+</sup> sparks and Ca<sup>2+</sup> store content in vas deferens myocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2003; 285: C195–C204.

Wickenden A. K channels as therapeutic drug targets. *Pharmacol Ther*. 2002; 94: 157–182

Wier WG, Morgan KG. Alpha1-adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 2003; 150: 91–139.

Wier WG, Morgan KG. Alpha1-adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 2003; 150: 91–139.

Wray S, Jones K, Kupittayanant S. Calcium signalling and uterine contractility. *J. Soc. Gynecol. Invest*. 2003; 10: 252–264.

Wray S. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. *Am. J. Physiol*. 1993; 264: C1–C18.

Wu C, Sui G, Fry CH. The role of the L-type Ca(2) channel in refilling functional intracellular Ca(2) stores in guinea-pig detrusor smooth muscle. *J Physiol*. 2002; 538: 357–369.

Yoshino M, Yabu H. Muscarinic suppression of Ca<sup>2</sup> current in smooth muscle cells of the guinea-pig urinary bladder. *Exp Physiol*. 1995; 80: 575–587.

Zhang WM, Yip KP, Lin MJ, Shimoda LA, Li WH, Sham JS. ET-1 activates Ca<sup>2+</sup> sparks in PASMC: local Ca<sup>2+</sup> signaling between inositol trisphosphate and ryanodine receptors. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. 2003; 285: L680–L690.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** FATMA NUR TAKI

**Doğum Tarihi:** 04.01.1986

**Doğum Yeri:** Konya

**İletişim Bilgileri:** [fntaki2023@gmail.com](mailto:fntaki2023@gmail.com)

**Öğrenim Durumu:**

Derece	Bölüm/Program	Kurum	Yıl
Lise	Lisesi	Özel Envar Koleji	2003
Lisans	Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği	Selçuk Üniversitesi	2004 – 2009
Y. Lisans	Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü	Selçuk Üniversitesi	2009 – 2011

## 8. EKLER



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve  
Araştırma Merkezi Müdürlüğü



Karar Sayısı: 2016 – 035

Karar Tarihi: 27.05.2016

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D'den Prof.Dr.Selim KUTLU ve Fatma Nur TAKI tarafından sunulan **"In vitro Sıçan Mesane Kasılmaları Üzerine Melatonin Reseptörlerinin Rolü"** başlıklı tez projesi 7 üyenin katılımı ile değerlendirildi.

Projede 4 grupta toplam 24 adet sıçan kullanılacağı ve sıçanların anestezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edileceği bildirilmiştir.

Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin, Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddeler gereğince "Etik Kurallara Uygunluk Esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddelerde belirtilen başvuru sahibinin sorumlulukları ve hayvan deneyleri ile ilgili etik ilkeler saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında yönerge ilkelerine uyulduğu ve çalışmanın deneysel kısmını gerçekleştirecek araştırmacıların deney hayvanları kullanım sertifikasına sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından **"Uygun"** olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Prof.Dr.Selim KUTLU  
Başkan-Katılmadı

Prof.Dr.Lema TAVLI  
Üye

Prof.Dr.Ayşe Saide  
ŞAHİN  
Üye

Prof.Dr.Mehmet GÜL  
Üye

Doç.Dr.Ercan KURAR  
Üye

Doç.Dr.Tevfik  
KÜÇÜKKARTALLAR  
Üye

Yrd.Doç.Dr.Hasan  
Hüseyin KOZAK  
Üye

Yrd.Doç.Dr.Ömer  
TANYELİ  
Üye

Vet.Hek.Halil Aydın  
ŞİMŞEK  
Üye-Katılmadı

Vet.Hek.Alpaslan ÖZKÜRÇÜLER  
Üye-Katılmadı

Mustafa ŞİRİN  
Üye-Katılmadı

Adres : Meram Tıp Fakültesi Kampüsü 42080 Akyokuş — Meram / KONYA  
Tel : +90 332 223 71 11 e-posta : [konudam@konya.edu.tr](mailto:konudam@konya.edu.tr)  
Faks : +90 332 223 71 24 Elektronik Ağ : <http://www.konya.edu.tr/merkezler/konudam>



preferences



Orijinallik Raporu

İşleme kondu: 20-Tem-2017 13:43 EEST  
 NUMARA: 832012550  
 Kelime Sayısı: 14163  
 Gönderildi: 1

## İN VİTRO SIÇAN MESANE KASILMALARI ÜZERİNE MEL... Fatma Nur-Taki tarafından

Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik
%5	Internet Sources: %4 Yayınlar: %2 Öğrenci Ödevleri: %1

Doküman Görüntüleyici

alintıları dahil et bibliyografyayı dahil et 5 kelime > çıkarılan eşleşmeler

mod: en yüksek eşleşme oranlarını bir arada göster

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ NECMETTİN ERBAKAN  
 ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

19

İN VİTRO SIÇAN MESANE KASILMALARI ÜZERİNE MELATONİN  
 RESEPTÖRLERİNİN ROLÜ Fatma Nur TAKI

**DOKTORA TEZİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**Danışman Prof. Dr. Selim KUTLU Bu araştırma**  
 Necmettin Erbakan **Üniversitesi Bilimsel Araştırma**  
**Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 141418003 proje**  
**numarası ile desteklenmiştir. KONYA 2017 i**

3

**ÖZET İN VİTRO SIÇAN MESANE KASILMALARI ÜZERİNE MELATONİN**  
**RESEPTÖRLERİNİN ROLÜ** Amaç: Bu tez çalışmasının amacı, in vitro  
 mesane kasılmaları üzerine melatonin reseptörlerinin olası etkilerinin  
 ve bu etkilerin meydana gelmesinde reseptör agonist ve  
 antagonistlerinin rollerinin araştırılmasıdır. Yöntem: Deneysel  
 çalışmalar, Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp

**Araştırma ve Uygulama Merkezi ile Necmettin**  
**Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Fizyoloji**  
**Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.**

1

- 1 %2 eşleşme (16-Haz-2015 tarihli internet)  
<http://earsiv.atauni.edu.tr>
- 2 %1 eşleşme (21-Eki-2015 tarihli öğrenci ödevleri)  
Submitted to Dumlupınar University
- 3 %< 1 eşleşme (25-May-2015 tarihli internet)  
<http://acikerisim.selcuk.edu.tr:8080>
- 4 %< 1 eşleşme (11-Ağu-2015 tarihli öğrenci ödevleri)  
Submitted to University of Edinburgh
- 5 %< 1 eşleşme (22-Şub-2016 tarihli internet)  
<http://earsiv.atauni.edu.tr>
- 6 %< 1 eşleşme (12-Ara-2009 tarihli internet)  
<http://tipdergisi.erciyes.edu.tr>
- 7 %< 1 eşleşme (14-Nis-2016 tarihli internet)  
<https://ira.le.ac.uk/bitstream/2381/29857/1/>
- 8 %< 1 eşleşme (15-Mar-2016 tarihli internet)  
<http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:808>