

MELATONİN VE
MELATONİN RESEPTÖRLERİNİN
AORTA VE HUVEC ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ
Uzm. Ecz. Şafak ULUSOYLAR YILDIRIM
Doktora Tezi

**Melatonin ve Melatonin Reseptörlerinin Aorta
ve HUVEC Üzerindeki Etkilerinin
Değerlendirilmesi**

Uzm. Ecz. Şafak Ulusoylar Yıldırım

Doktora Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Anabilim Dalı

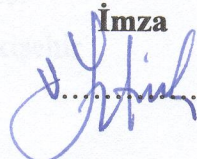
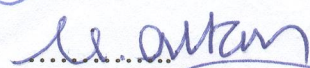
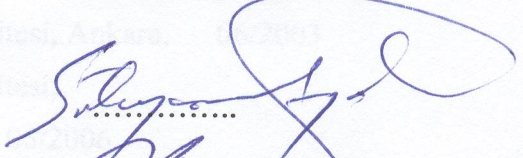
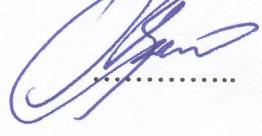
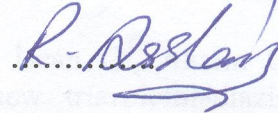
Eskişehir, Temmuz 2013

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yusuf Öztürk

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 1109S137).**

Juri ve Enstitü Onayı

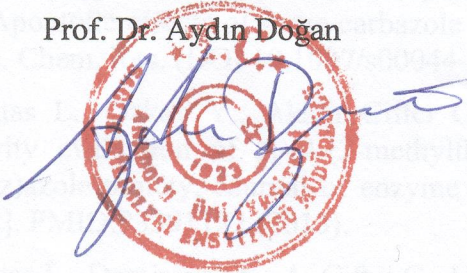
Şafak Ulusoylar Yıldırım'ın 'Melatonin ve Melatonin Reseptörlerinin Aorta ve HUVEC Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi' başlıklı, Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki doktora tezi, 19/7/2013 tarihinde, aşağıdaki juri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez danışmanı)	Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Melih Altan Ankara Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Süleyman Aydın Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Bülent ERGUN Anadolu Üniversitesi	
Üye	Yard. Doç. Dr. Rana ARSLAN Anadolu Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08/7/2013 tarih ve 25/1 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Aydın Doğan



ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Şafak Ulusoylar Yıldırım
Doğum tarihi ve yeri : 16.09.1980, Kayseri
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Evli
İletişim Adresleri : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı, 26470, Eskişehir
Telefon : 0 553 523 44 96
e-posta : suyildirim@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

Lisans : Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara, 06/2003
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara, 06/2006
Yabancı Dil : İngilizce

Yayınlar

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler,

Altıntop M.D., Kaplancıklı Z.A., Turan-Zitouni G., Ozdemir A., İscan G., Akalin G., Ulusoylar Yıldırım S., Synthesis and anticandidal activity of new triazolothiadiazine derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46; 5562-5566 (2011).

Kaplancıklı Z.A., Yurttaş L., Turan-Zitouni G., Ozdemir A., Ozic R., and Ulusoylar-Yıldırım S., Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity of some new carbazole derivatives, *J Enzyme Inhib Med Chem.*, 27(6):868-74 (2012).

Ozdemir A., Altıntop M.D., Kaplancıklı Z.A., Turan-Zitouni G., Akalin Ciftci G., Ulusoylar Yıldırım S., Synthesis of 1-acetyl-3-(2-thienyl)-5-aryl-2-pyrazoline derivatives and evaluation of their anticancer activity, *J Enzyme Inhib Med Chem.*, 23020635, (2012).

Akalin Çiftçi G., Temel H.E., Ulusoylar Yıldırım Ş., Kaplancıklı Z.A., Altıntop M.D., Genç L., Apoptotic effects of some carbazole derivatives on lung carcinoma and glioma cell lines, *Med. Chem. Res.* (DOI 10.1007/s00044-012-0325-2), (2012)

Yurttaş L., Ozkay Y., Akalin-Ciftci G., Ulusoylar-Yıldırım S., Synthesis and anticancer activity evaluation of N-[4-(2-methylthiazol-4-yl)phenyl]acetamide derivatives containing (benz)azole moiety, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, [Epub ahead of print], PMID:23391122 (2013).

Yurttaş L., Demirayak S., A. Ciftci G., Ulusoylar Yıldırım S., Kaplancıklı Z.A., Synthesis and Biological Evaluation of Some 1,2-Disubstituted Benzimidazole Derivatives as New Potential Anticancer Agents, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 1–12 (2013).

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler,

Ulusoylar Ş., Ceylan-Işık A., Arı N., Ozansoy G., Effects of cronicly low dose fluvastatin treatment in STZ diabetic rats and vascular reactivity of aorta, *Atherosclerosis Suppl* (E.J.

Schaefer, J. Shepherd), XIV International Symposium on Atherosclerosis, Haziran 18-22, Roma, vol 7, issue 3, s.569 (2006).

Ozansoy G., Ulusoylar Ş., Ceylan- Işık A., Erdoğan-Tulmaç Ö, Arı N.,The investigation of effects of combination of hormone replacement therapy with atorvastatin on vascular functions of ovariectomized rats, Gynecological Endocrinology (Suppl.1) (A. R. Genazzani), 13th World Congress of Gynecological Endocrinology, Şubat 28-Mart 2, Florence,,:vol 24, s.145 (2008).

Ozansoy G., Ulusoylar Ş., Akhayeva T., Ceylan-Işık A., Erdoğan-Tulmaç Ö., Arı N. Comparison of effect of estrogen / HRT and atorvastatin treatment on endothelium dependent relaxation in ovariectomized rats, International Coronary Artery Disease Congress Abstract Book (B.S. Lewis), 8th International Congress on Coronary Artery Disease (ICCAD 2009), Kasım 23-26, Prague, (2009).

Canturk Z., Dikmen M., Yildirim S.U., Gorgulu S., Yaramis, A., Genc L., Curcumin synergistically potentiates apoptotic and cytotoxic effects of atorvastatin on human lung cancer cells, Basic & clinical pharmacology & toxicology Volume: 109, Issue Supplement s1 (K. Brosen), 10th EACPT Congress, haziran 26-29, Budapest, p.58 (2011).

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler,

Arı N., Cumaoglu A., Ulusoylar Ş., Ceylan-Işık A., Şakul A.A., Arıcioglu A., Karasu Ç., Ozansoy G., Non cholesterol lowering dose, long-term fluvastatin treatment reduces nitrosative stress with amelioration of endothelial dysfunction in aorta from STZ-diabetic rats, III. Antiaging Congress Abs book, III: International Anti-aging Congress, 2-5 Aralık , Ankara, p. 88, (2010) .

Bilimsel Etkinlikler

Burslar: TÜBİTAK BİDEB 2210 Yurtiçi Yüksek Lisans Burs Programı 2004-2006

University Of Wyoming Molecular Biology Phd Scholarship Programme 2006-2007

TÜBİTAK BİDEB 2211 Yurtiçi Doktora Burs Programı 2007-2013

Projeler: Kaplancıklı, Z.A., Yurttaş, L., Akalın G., Yıldırım U. Ş., Bazı 1-(2-aril-2-okzoetil)-2-[(morfolin-4-il)tiyoksometil]benzimidazol türevlerinin sentezi ve antikanser etkilerinin araştırılması, 2010.

Öztürk, Y., Yıldırım U. Ş., Streptozotosin (STZ) diabetik sıçanlarda melatonin reseptörlerinin değerlendirilmesi, 2010.

Katılan Kurslar ve Eğitim Programları:

T.C. Osmangazi Üniversitesi, Tıbbi-Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TICAM), Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

ÖNSÖZ

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı'ndaki doktora eğitim ve öğretimime katkıda bulunan herkese teşekkürü bir borç bilirim.

Derin bilgi, engin hoşgörü ve yüksek insanlık değerleriyle her zaman örnek aldığım değerli hocam, sayın dekanımız Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e,

Doktora tezimle ilgili bilgilerinden istifade ettiğim bütün hocalarıma, Prof. Dr. Bülent ERGUN, Prof. Dr. Tansu KOPARAL, Prof. Dr. Süleyman AYDIN, Yard. Doç. Dr. Rana ARSLAN, Yrd. Doç. Dr. Özgür Devrim CAN, Yard. Doç. Dr. Nurcan BEKTAŞ, Araş. Gör. Ümide DEMİR ÖZKAY ve deneylerime katkısından dolayı vet. Erdem ERKUŞ'a,

BİBAM'daki çalışmalarımıza destek olan Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI, Doç. Dr. Lütfi GENÇ ve BİBAM personeline,

Ayrıca doktora süresince her ay düzenli olarak bana burs veren TÜBİTAK BİDEB 2211 nolu Yurtiçi Doktora Burs Programına ve doktora projemizi destekleyen Anadolu Üniversitesi Proje Birimi'ne,

Sevgili arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Leyla YURTTAŞ, Yrd. Doç. Dr. Gülşen AKALIN, Araş. Gör. Dilek ALTINTOP, Araş. Gör. Hale Gamze DUYSUŞ, Araş. Gör. Tuba KIYAN, Uzm. Nagihan SALTAN, Şennur GÖRGÜLÜ, Duygu ABBASOĞLU, Arzu İŞCAN, Umut İrfan ÜÇEL, Selin ENGÜR, Buket DEMİRTAŞ, Elif KAYA'ya,

Tabii ki her zaman yanımda olan hayat arkadaşım, kıymetli eşim Yard. Doç. Dr. Zubeyr YILDIRIM, canım oğlum Ali Münir YILDIRIM, sevgili kardeşim Dr. Neziha ULUSOYLAR, hayatımın her aşamasında maddi manevi beni destekleyen sevgili babam Dt. Naim ULUSOYLAR'a ve canım annem Jin. Dr. Seher ULUSOYLAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

MELATONİN ve MELATONİN RESEPTÖRLERİNİN AORTA ve HUVEC ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Özet

Zamanla insanlarda pineal bezden salgısı azalan melatonin, serebral ve periferik etkiler gösterdiği gibi vasküler etkiler de göstermektedir. Bu çalışmada melatoninin etkisi melatonin reseptör antagonistleri ile kıyaslanarak ortaya çıkan vasküler cevaplar ve hücre içi yanıtlar sıçan aortu ve *Human umbilical vein endothelial cell* (HUVEC) hücre dizisi üzerinde değerlendirilmiştir.

Bu amaçla sağlıklı erkek albino Wistar sıçanlardan (350-400g), endoteli sağlam torakal aortalar çıkarıldı ve aorta halkaları inkübasyon materyaline göre dört gruba ayrıldı. Birinci grup olan, kontrol grubu aortalara hiçbir inkübasyon yapılmadı. İkinci grup non-selektif MT reseptör agonisti (10^{-5} M) melatonin (MLT), üçüncü grup nonselektif MT reseptör antagonisti (10^{-5} M) luzindol (LZL), dördüncü grup (10^{-5} M) MLT ve (10^{-5} M) LZL kombinasyonu ile inkübe edildi. İnkübasyon periodunun ardından kümülatif KCl (10 - 50 mM) veya Phe (3×10^{-9} - 10^{-6} M) ile elde edilen vazokonstriktif cevaplar, ayrıca Ach (10^{-10} - 10^{-5} M) veya SNP (3×10^{-9} - 10^{-6} M) ile elde edilen vazorelaksan cevaplar kıyaslandı. Veriler iki yönlü varyans analizi ve ardından Bonferroni testi (n:5) (Graph Pad) uygulanarak değerlendirildi. Endotel hücresi deneyleri için ise HUVEC hücre dizisi F12 medyumunda kültüre alındı ve inkübasyon materyaline göre 5 gruba ayrıldı. Birinci grup hiçbir inkübasyon yapılmayan kontrol hücrelerden oluşmaktadır. İkinci grup (10 - 10^{-7} M) MLT ile, üçüncü grup (10 - 10^{-7} M) MLT ve (10^{-5} , 10^{-6} M) LZL ile, dördüncü grup (10 - 10^{-7} M) MLT ve (10^{-5} , 10^{-6} M) 4P-PDOT ile, beşinci grup (10 - 10^{-7} M) MLT ve (10^{-5} , 10^{-6} M) GR135531 ile 24 saat inkübe edilmiştir. Bu gruplara daha sonra MTT, kalsiyum miktar tayini ve total nitrat/nitrit miktar tayini yapılmıştır. Sonuçlar kontrole göre yüzde olarak verilmiş, iki yönlü varyans analizi ve ardından Bonferroni testi (n:3) yapılarak değerlendirilmiştir (Graph Pad).

(10^{-5} M) MLT inkübasyonu (3×10^{-7} - 10^{-5} M) Phe ve (20mM) KCl ile elde edilen vazokonstriktif yanıtları anlamlı olarak arttırdı ve bu artış (10^{-5} M) LZL veya (10^{-5} M) MLT ve LZL kombinasyonunda görülmedi. Ayrıca 10^{-5} M MLT, Phe ve KCl eğrilerinden elde edilen EC₅₀ değerlerini belirgin olarak arttırdı, bu sonuçlara uygun olarak 10^{-5} M LZL ve 10^{-5} M MLT ve LZL kombinasyonunda bu artış görülmedi. Fakat hiçbir grupta Ach ile elde edilen vazorelaksan cevaplarda belirgin bir değişiklik olmadı. 10^{-5} M MLT ile inkübasyon (3×10^{-7} and 10^{-7} M) SNP ile elde edilen vazorelaksan cevapları arttırdı, bu sonuçlara uygun olarak 10^{-5} M LZL veya 10^{-5} M MLT ve LZL kombinasyonunda bu artmış cevaplar kontrol seviyelerine kadar azaldı. Melatoninin MT reseptörleri aracılığıyla ortaya çıkan sitotoksik etkileri olup olmadığını anlamak için HUVEC hücre dizisi kullanarak MTT testi gerçekleştirildi. 10 - 10^{-3} M MLT hücre canlılığını yüzde olarak belirgin biçimde düşürdü (sırasıyla % 60 ± 4 , 66 ± 2 , 55 ± 1 , 65 ± 1 , 64 ± 4). fakat 10^{-4} - 10^{-7} M konsantrasyonlarda ise MLT hücre canlılığını kontrole göre hafif bir şekilde arttırdı. 10^{-2} ve 10^{-3} M MLT'e 10^{-5} M LZL or 10^{-5} M 4P-PDOT eklenmesi hücre canlılığını belirgin olarak arttırdı ve kontrol seviyelerine ulaştırdı. Benzer sonuçlar 10^{-1} - 10^{-3} M MLT'e 10^{-6} M LZL veya 10^{-6} M 4P-PDOT eklenerek de elde edilmiştir. Buna rağmen MLT (10 - 10^{-7} M) ile 10^{-5} veya 10^{-6} M GR135531 inkübasyonu, MLT (10 - 10^{-7} M)'e göre sitotoksiste üzerinde hiçbir fark ortaya çıkarmamıştır. MLT (10^{-1} - 10^{-7} M) inkübasyonu hücre içi kalsiyum miktarı yüzdesini ise arttırdı ve MLT ile 10^{-5} veya 10^{-6} M LZL ve 10^{-5} M veya 10^{-6} M 4P-PDOT kombinasyonu intraselüler kalsiyum seviyesini belirgin olarak azalttı fakat MT3 reseptör agonisti GR135531 kombinasyonu ise MLT ile kıyaslandığında hücre içi kalsiyum miktarı bakımından hiçbir değişiklik göstermedi. HUVEC hücreleri ile melatonin ve melatonin reseptörlerinin NO üzerindeki etkisini anlamak amacıyla NO miktarının bir göstergesi olan total nitrit/nitrat miktar tayini yapılmıştır. 10^{-4} mM MLT ile

azalan total nitrit/nitrat miktarı, 10^{-5} M 4P-PDOT veya 10^{-5} M GR135531 ile birlikte inkübasyon yapıldığında anlamlı artış göstermiştir. 10^{-5} mM MLT ile 10^{-5} M luzindol kombine olarak inkübe edildiğinde total nitrit nitrat miktarının 10^{-5} M MLT'ye göre anlamlı olarak azaldığı görülmektedir.

MT reseptörlerinin vasküler etkilerinin değerlendirildiği çalışmaların çoğu ya sıçan kaudal arteri yada sıçan serebral arteri kullanılarak yapılmıştır. Kaudal arter (kuyruk arteri) sıçanda önemli görevler ifa ederken insanda kaudal arter hem çok kısa hem de etkisi çok sınırlıdır, serebral arter ise genel vasküler basıncın bir göstergesi olarak kabul edilmekten uzaktır. Dolayısıyla serebral arter veya kaudal arterde görülen etkilerin, aorta gibi özel fonksiyonları olan damarlarda dahil olmak üzere, bütün damar yataklarında aynı şekilde olması gerekir gibi bir genelleme yapmak doğru olmayabilir. Bu sebepten aortada melatonin ve melatonin reseptörlerinin etkileri ayrıca incelenmelidir. Sıçan torakal aortasında protein ve mRNA seviyesinde yalnız MT1 reseptörü bulunması; bu reseptörlerin de endotelde (*Tunica adventitia*) yoğunlaşması sebebiyle, bu çalışmada 10^{-5} M MLT, KCl veya Phe ile elde edilen vazokonstriktör cevaplar ve SNP ile elde edilen vazorelaksan cevaplar, endoteli sağlam aortada MT1 reseptörü aracılığıyla ortaya çıkmaktadır. HUVEC kullanarak elde ettiğimiz sonuçlar ise 10^{-10} - 10^{-3} M MLT'in daha çok MT2 reseptörleri aracılığıyla olmak üzere MT1/MT2 reseptörleri üstünden sitotoksik etkiler ortaya çıkardıkları sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca MLT hücre içi Ca^{2+} seviyelerini MT1/MT2 reseptörleri aracılığıyla artırmaktadır, MT3 reseptörü ise hücre içi Ca^{2+} miktarına etki etmemektedir. Total nitrit nitrat miktarı ölçülerek yapılan deneylerden elde edilen sonuçlara dayanarak MLT'nin HUVEC hücrelerinde NO miktarını baskıladığı ve bu etkiyi başlıca MT2 reseptörleri aracılığıyla yaptığı sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Melatonin, melatonin reseptörleri, HUVEC, aorta, vazoreaktivite, nitrik oksit, kalsiyum, sitotoksisite

ABSTRACT

Melatonin which its secretion from pineal gland decreases gradually in human, has not only interserebral and peripherical impacts but also has vascular effects. In this study the vascular responses and intracellular mechanisms of melatonin were evaluated by comparing melatonin and melatonin receptor antagonists using rat aortae and HUVEC cell line.

For this purpose we extracted the thoracal aortae of healthy male Wistar albino rats (350-400g) which has intact endothelia. We divided the aortic rings into four groups due their incubation material. 1st group was control aortae without any incubation, 2nd group was incubated in nonselective MT receptor agonist 10^{-5} M Melatonin (MLT), 3rd group was incubated in nonselective MT receptor antagonist 10^{-5} M Luzindol (LZL), 4th group was incubated in combination of 10^{-5} M MLT and 10^{-5} M LZL. After the incubation period, we evaluated the vasoconstrictive responses of cumulative potassium chlorure (KCl; 10-50mM) or phenylephrine (Phe; 3×10^{-9} - 10^{-6} M) and vasorelaxant responses of cumulative acetylcholine (Ach; 10^{-10} - 10^{-5} M) or sodyum nitroprussid (SNP; 3×10^{-9} - 10^{-6} M). Data were analysed by using two way ANOVA and Bonferroni Post Test (n:5) (Graph Pad). For endothelial experiments HUVEC cell line was cultured in F12 medium, and then, was divided into 5 groups depending on the incubation material: 1st group was control HUVECs without any incubation, 2nd group incubated in (10^{-10} - 10^{-7} M) MLT, 3rd group incubated in (10^{-10} - 10^{-7} M) MLT and (10^{-5} or 10^{-6} M) LZL, 4th group incubated in (10^{-10} - 10^{-7} M) MLT and (10^{-5} or 10^{-6} M) 4P-PDOT, 5th group incubated in (10^{-10} - 10^{-7} M) MLT and (10^{-5} or 10^{-6} M) GR135531 for 24 hours. Then MTT, calcium assay and total nitrate/nitrit assays were carried out using these groups. Results were compared by using two way ANOVA and Bonferroni Post test (n:3) (Graph Pad).

The vasoconstrictive responses of (3×10^{-7} - 10^{-5} M) Phe and (20mM) KCl were increased significantly by incubation of 10^{-5} M MLT and this increase was not observed by incubation of 10^{-5} M LZL or combination of 10^{-5} M MLT and 10^{-5} M LZL. Also, the EC_{50} values of KCl and Phe curves increased significantly in the presence of 10^{-5} M MLT, in accordance with that, not in the presence of 10^{-5} M LZL or combination of 10^{-5} M MLT and 10^{-5} M LZL. But, there were no significant changes on vasorelaxant responses of Ach in any group. Incubation of 10^{-5} M MLT increased the vasorelaxant responses of (3×10^{-7} and 10^{-7} M) SNP in accordance to that 10^{-5} M LZL or both combination of 10^{-5} M MLT and 10^{-5} M LZL reduced these increased responses to control levels. We performed MTT test on HUVEC cell line to find out if these is MT receptor-mediated cytotoxic effects of MLT. 10^{-4} - 10^{-7} mM concentrations of MLT reduced the percentage of cell viability significantly (60 ± 4 , 66 ± 2 , 55 ± 1 , 65 ± 1 , 64 ± 4 %, respectively) but 10^{-4} - 10^{-7} mM concentrations of MLT slightly increased the percentage of cell viability compared to control cells. 10^{-5} M LZL or 10^{-5} M 4P-PDOT addition to 0,01 and 0,001 mM MLT increased the percentage of cell viability significantly to control levels. Similar results were obtained when 10^{-6} M LZL or 4P-PDOT were added to 0,1-0,001 mM MLT. However, incubation of (10^{-5} or 10^{-6} M) GR135531 with MLT (10^{-10} - 10^{-7} mM) did not make any difference when compared to only MLT. We have also observed that MLT ($0,1$ - 10^{-7} mM) incubation increased percentage of intracellular calcium (Ca^{2+}) concentration and 10^{-5} M or 10^{-6} M LZL or 10^{-5} M or 10^{-6} M 4P-PDOT reduced intracellular Ca^{2+} levels significantly, but MT3 receptor agonist GR135531 did not exhibits any change when its compared to MLT.

HUVEC were used to evaluate the effects of melatonin and melatonin receptors on NO production by total nitrite/nitrate amount assay. The reduction of total nitrite/nitrate amount by 10^{-4} mM MLT were increased by combined incubation of 10^{-5} M 4P-PDOT and 10^{-5} M GR135531. 10^{-5} mM MLT and 10^{-5} M luzindole incubation total nitrite/nitrate amount were reduced when it was compared with 10^{-5} mM MLT.

Most of the studies that evaluate the vascular effects of MT receptors have done by using either rat caudal or cerebral arteries. It seems likely to oversimplify generalizing these effects to all blood vessels. In conclusion, 10^{-5} M MLT was increased the vasoconstrictive responses of KCl or Phe and the vasorelaxant responses of SNP through MT1 receptors in endothelium intact rat aortae. These data indicates that 10^{-10} - 10^{-3} mM MLT exhibits cytotoxic effects through MT1/MT2 receptors. Also MLT increased the intracellular Ca^{2+} levels through MT1/MT2 receptors. MLT was increased intercellular Ca^{2+} concentration by MT1/MT2 receptors but MT3 receptor did not change intercellular Ca^{2+} concentration. Due to the results that we got from the total nitrite nitrate assays, MLT slightly decreased NO by using MT2 receptors.

Key Words: Melatonin, melatonin receptors, HUVEC, aortae, vasoreactivity, nitric oksit, calcium.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Melatonin Keşfi	2
Karanlığın Hormonu: Melatonin	2
Pineal Bez (Epiphysis cerebri)	3
<i>Melatonin Biosentezi ve NE ile Bağlantısı</i>	4
<i>Melatonin Biyoeliminasyonu</i>	5
<i>Melatoninin Fiziolojik Sistemlere Etkisi</i>	5
<i>Melatonine Bağlı Uyarılan Hücre İçi Mekanizmalar</i>	7
<i>Melatonine Ait Antioksidan Özellikler ve MT3 Reseptörü (Kinon Redüktaz II)</i>	7
<i>Melatoninin Bağlandığı Çekirdek Reseptörleri: RZR/RORa, RZRβ</i>	9
<i>Melatonin Reseptörleri: MT1 ve MT2</i>	9
Melatonin ve Kardiovasküler Sistem	15
Vasküler Sistemde Rol Oynayan Ajanlar	19
<i>Potasyum Klorür</i>	19
<i>Fenilefrin</i>	20
<i>Asetilkolin</i>	21
<i>Sodyum Nitroprussid</i>	22
<i>Nitrik Oksit</i>	22
GEREÇLER	22
Vasküler Fonksiyon Deneylerinde Kullanılan Sıçan Aortası	22
Endotel Deneylerinde Kullanılan HUVEC Hücre Dizisi	22
HUVEC ve Aorta Deneylerinde Ortak Kullanılan Kimyasallar	22
Aorta Deneylerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
Aorta Deneylerinde Kullanılan Malzemeler	23

Aorta Deneylerinde Kullanılan Cihazlar	23
HUVEC Deneylerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
HUVEC Deneylerinde Kullanılan Malzemeler	24
HUVEC Deneylerinde Kullanılan Cihazlar	24
YÖNTEMLER	24
Aorta Deneyleri	25
<i>Kimyasal Maddelerin Hazırlanması</i>	25
<i>Sıçan Torakal Aortasının İzolasyonu</i>	25
<i>Deney Grupları ve İnkübasyon İşlemleri</i>	25
<i>Vasküler Fonksiyon Testleri</i>	26
<i>Aortanın Standardizasyonu ve 40mM KCl ile Konsantrasyon Cevap Deneyleri</i>	26
<i>Endotel Varlığının Tespiti</i>	26
<i>Kümülatif Phe Konsantrasyon Cevap Deneyleri</i>	26
<i>Kümülatif Ach Konsantrasyon Cevap Deneyleri</i>	26
<i>Kümülatif SNP Konsantrasyon Cevap Deneyleri</i>	26
HUVEC Deneyleri	27
<i>Hücrelerin Çoğaltılması</i>	27
<i>Hücre Sayımı</i>	27
<i>MTT Sitotoksosite Ölçümleri</i>	27
<i>Total Nitrit+ Nitrat Miktar Tayini</i>	28
<i>Kalsiyum (Ca²⁺) Miktar Tayini</i>	29
Sonuçların Analizi	30
BULGULAR ve TARTIŞMA	30
Endoteli Sağlam Sıçan Aortasında Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular	30
<i>Potasyum Klorür (40 mM) Kasılma Yanıtları Yüzdeleri</i>	32
<i>Kümülatif Potasyum Klorür (10-50mM) ile Kasılma Yanıtları Yüzdeleri</i>	32
<i>Kümülatif Fenilefrin (3x10⁻⁹- 10⁻⁵ M) Kasılma Yanıtları Yüzdeleri</i>	33
<i>Kümülatif Ach (3x10⁻¹⁰-10⁻⁵M) Gevşeme Yanıtları Yüzdeleri</i>	36
<i>Kümülatif SNP (3x10⁻⁹-10⁻⁵M) Gevşeme Yanıtları Yüzdeleri</i>	37
Endotelsiz Sıçan Aortasında Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular	38
<i>Ardından Kümülatif Ach (10⁻¹⁰, 3x10⁻⁵ M) Gevşeme Yanıtları Yüzdeleri</i>	38
<i>Ardından Kümülatif SNP (10⁻⁹-10⁻⁶ M) Gevşeme Yanıtları Yüzdeleri</i>	39
HUVEC Hücre Dizisi ile Yapılan Deneylerden Elde Edilen Bulgular	41
<i>MTT Sitotoksosite Testi Yüzde Canlılık Değerleri</i>	41
<i>10⁻⁵ M GR135531, LZL ve 4P-PDOT ile Yüzde Canlılık</i>	41

<i>10⁻⁶ M GR135531, LZL ve 4P-PDOT ile Yüzde Canlılık</i>	43
<i>10⁻⁷ M GR135531, LZL ve 4P-PDOT ile Yüzde Canlılık</i>	45
Total Nitrit/Nitrat Miktar Tayini	46
<i>10⁻⁵ M GR135531, LZL ve 4P-PDOT ile Total Nitrit/Nitrat Miktarı</i>	47
<i>10⁻⁶ M GR135531, LZL ve 4P-PDOT ile Total Nitrit/Nitrat Miktarı</i>	48
Kalsiyum Miktar Tayini	49
<i>10⁻⁵ M GR135531, LZL ve 4P-PDOT ile Kalsiyum Miktarı</i>	49
<i>10⁻⁶ M GR135531, LZL ve 4P-PDOT ile Kalsiyum Miktarı</i>	50
SONUÇLAR ve ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.	Melatonin Reseptörleri, Agonist ve Antagonistleri ve Sinyal İletim Yolakları	14
Çizelge 2.	Standart Krebs Çözeltisi	27
Çizelge 3.	Nitrat Standart Seri Çözeltileri Oluşturulurken Kullanılan Nitrat Standardı ve Ölçüm Tamponu Miktarı	30
Çizelge 4.	Kalsiyum Standart Seri Çözeltileri Oluşturulurken Kullanılan Kalsiyum Standardı ve Final Kalsiyum Derişimi	31
Çizelge 5.	Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında KCl Konsantrasyon Yanıt Eğrisinden Elde Edilen LogEC_{50} Değerleri	35
Çizelge 6.	Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında Kümülatif Phe Konsantrasyon Yanıt Eğrisinden Elde Edilen pD_2 Değerleri	
Çizelge 7.	Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında Fenilefrin ile Ön Kasılmanın Ardından Kümülatif Ach Konsantrasyon Yanıt Eğrisinden Elde Edilen pD_2 Değerleri	
Çizelge 8.	Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında Fenilefrin ile Ön Kasılmanın Ardından Kümülatif SNP Konsantrasyon Yanıt Eğrisinden Elde Edilen pD_2 Değerleri	
Çizelge 9.	Endotelsiz Aortada Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında Fenilefrin ile Ön Kasılmanın Ardından Kümülatif Ach Konsantrasyon Yanıt Eğrisinden Elde Edilen pD_2 Değerleri.	
Çizelge 10.	Endotelsiz Aortada Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında Fenilefrin ile Ön Kasılmanın Ardından Kümülatif SNP Konsantrasyon Yanıt Eğrisinden Elde Edilen pD_2 Değerleri.	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Melatoninin Kimyasal Yapısı	2
Şekil 2.	Pineal Bezin Serebral Konumu	4
Şekil 3.	Pineal Bezde Melatonin Sentez Yolağı	5
Şekil 4.	Melatonin ile Oluşan Hücre İçi Cevaplar	7
Şekil 5:	Yapısal Aktivite Üzerindeki Ligand Etkinliğı.	11
Şekil 6.	Radyoaktif İyodomelatonin Bağlanmasını Azaltan Ligand Aktiviteleri	12
Şekil 7.	MT1 ve MT2 Melatonin Reseptörleri ile Aktive Edildiğı Düşünülen Sinyal Yolakları	13
Şekil 8.	Uyku Bozukluğı ve Hipertansiyon Arasındaki İlişki	15
Şekil 9.	K ⁺ Kanalı Aktive Olduğunda (A), K ⁺ Kanalı İnhibe Olduğunda (B), Vasküler Düz Kasda Meydana Gelen Değişiklikler	19
Şekil 10.	Endotel Hücrelerde Ach ile Oluşan Vazorelaksan Cevap Yolağı	22
Şekil 11.	Artan Konsantrasyonda Nitrat Standardı ile Elde Edilen Absorbans Değerleri ve Grafiğe Ait Doğru Denklemi	31
Şekil 12.	Artan Konsantrasyonda Kalsiyum Standardıyla Elde Edilen Absorbans Değerleri ve Grafiğe Ait Doğru Denklemi	32
Şekil 13.	Melatonin (10 ⁻⁵ M) ve/veya Luzindol (10 ⁻⁵ M) Varlığında KCl (40mm) ile Kasılma Yanıtları Yüzdesi.	33
Şekil 14.	Melatonin (10 ⁻⁵ M) ve/veya Luzindol (10 ⁻⁵ M) Varlığında Yüzde KCl Konsantrasyon Yanıt Eğrisi	34
Şekil 15.	Melatonin (10 ⁻⁵ M) ve/veya Luzindol (10 ⁻⁵ M) Varlığında Kümülatif Phe Konsantrasyon Yanıt Eğrisi.	36
Şekil 16.	Melatonin (10 ⁻⁵ M) ve/veya Luzindol (10 ⁻⁵ M) Varlığında Phe (10 ⁻⁵ M) İle Ön Kasılmanın Ardından Uygulanan Kümülatif Ach ile Gevşeme Yanıtları Yüzdeleri.	38
Şekil 17.	Melatonin (10 ⁻⁵ M) ve/veya Luzindol (10 ⁻⁵ M) Varlığında (10 ⁻⁵ M) Phe ile Ön Kasılmanın Ardından Uygulanan Kümülatif SNP yanıtlarının yüzdeleri.	39
Şekil 18.	Endotelsiz Aortada Yapılan Melatonin (10 ⁻⁵ M) ve/veya Luzindol (10 ⁻⁵ M) Varlığında (10 ⁻⁵ M) Phe ile Ön Kasılmanın Ardından Verilen Kümülatif Ach Yanıt Yüzdeleri.	41

Şekil 19.	Endotelsiz Aortada Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında (10^{-5} M) Phe ile Ön Kasılmanın Ardından Verilen Kümülatif SNP Konsantrasyon Yanıt Yüzdesi.	42
Şekil 20.	HUVEC Hücre Dizisine Sırasıyla Melatonin ve Melatonine Eklenen GR 135531 (10^{-5} M), 4P-PDOT (10^{-5} M), Luzindol (10^{-5} M) İnkübasyonu Sonunda Elde Edilen % Canlılık.	44
Şekil 21.	HUVEC Hücre Dizisine 24 Saatlik Melatonin ve Sırayla Melatonine Eklenen GR135531 (10^{-6} M), 4P-PDOT (10^{-6} M), Luzindol (10^{-6} M) İnkübasyonu Sonunda Elde Edilen % Canlılık.	46
Şekil 22.	HUVEC Hücre Dizisine 24 Saatlik Melatonin ve Sırayla Melatonine Eklenen GR135531 (10^{-7} M), 4P-PDOT (10^{-7} M), Luzindol (10^{-7} M) İnkübasyonu Sonunda Elde Edilen % Canlılık.	47
Şekil 23.	HUVEC Hücre Dizisine Azalan Konsantrasyonda Uygulanan Melatonin ($1-10^{-7}$ mM) ve Melatonin ile Kombine Edilen GR135531 (10^{-5} M), 4P-PDOT (10^{-5} M), ve Luzindol (10^{-5} M) ile 24 saatlik inkübasyonun ardından belirlenen % Total Nitrit+Nitrat Miktarı.	50
Şekil 24.	HUVEC Hücre Dizisine Azalan Konsantrasyonda Uygulanan Melatonin ($1-10^{-7}$ mM) ve Melatonin ile Kombine Edilen GR135531 (10^{-6} M), 4P-PDOT (10^{-6} M), ve Luzindol (10^{-6} M) ile 24 Saatlik İnkübasyonun Ardından Belirlenen % Total Nitrit+Nitrat Miktarı.	51
Şekil 25.	HUVEC Hücre Dizisine Artan Konsantrasyonda Uygulanan Melatonin ($1-10^{-7}$ mM) ve Melatonin ile Kombine Edilen GR135531 (10^{-5} M), 4P-PDOT (10^{-5} M), ve Luzindol (10^{-5} M) İle 24 Saatlik İnkübasyonun Ardından Medyumda Bulunan % Kalsiyum Miktarı.	52
Şekil 26.	HUVEC Hücre Dizisine Artan Konsantrasyonda Uygulanan Melatonin ($1-10^{-7}$ mM) ve Melatonin ile Ayrı Ayrı Kombine Edilen GR135531 (10^{-6} M), 4P-PDOT (10^{-6} M), ve Luzindol (10^{-6} M) ile 24 Saatlik İnkübasyonun Ardından Medyumda Bulunan % Kalsiyum Miktarı.	53

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

4P-ADOT:	4-Fenil-2-asetamidotetralin
4P-CADOT:	4-Fenil-2 kloroasetamidotetralin
4P-PDOT:	4-Fenil-2-propiyonamidotetralin
5-MCA-NAT:	5-Metoksikarbonilamino- <i>N</i> -asetiltriptamin
5-HT:	5-Hidroksitriptamin
5-MIAA:	5-Metoksiindol asetik asit
5-MTOL:	5-Metoksitriptofol
8M-PDOT:	8-Metoksi-2-propiyonamidotetralin
AMMTC:	<i>N</i> -Asetil-4 aminometil-6-metoksi-9-metil-1,2,3,4-tetrahidrokarbazol
AANAT:	Arilalkilamin <i>N</i> -asetiltransferaz
AFMK:	<i>N</i> 1-asetil- <i>N</i> 2-fomil-5-metoksikinuramin
ALT :	Alanin amino transferaz
Ach:	Asetilkolin
ATP:	Adenozin trifosfat
BİBAM:	Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezi
BK _{Ca} kanalı:	Ca ⁺² -ile aktive olan K ⁺ iletim kanalı
c-kinaz:	Protein kinaz C
CaCl ₂ :	Kalsiyum klorür
Ca ²⁺ L-kanalı:	Voltaj-bağımlı Ca ²⁺ kanalı
cAMP:	Siklik adenozin 3',5'-monofosfat
cGMP:	Siklik guanozin 3',5'-monofosfat
CNG-kanalı:	Siklik nükleotid-kapılı kanal
CHO:	<i>Chienese hamster ovary</i> hücreleri
CO ₂ /O ₂ Tüpü:	%95 oksijen, %5 karbondioksit içeren tüp
CREB:	cAMP- <i>responsive element-binding protein</i>
D-Glucose:	Dekstrojir glikoz
DAG:	Diaçilgliserol
DMSO:	Dimetilsülfoksit
EC:	<i>Enzyme commission number</i>
EGF:	<i>Endothelial growth factor</i>
ELISA:	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ER:	Endoplazmik retikulum
FBS	Fötal sığır serumu
g:	Gram

G _i ,b,c:	Altbirimleri olan G _i proteini
GMP:	Guanin monofosfat
GK:	Goto–Kakizaki
G _q ,b,c:	Alt birimleri olan G _q proteini
GR135531:	5-Metoksikarbonilamino- <i>N</i> -asetiltriptamin (5-MCA-NAT)
GR 196429:	<i>N</i> -[2-[2,3,7,8-Tetrahidro-1 <i>H</i> -furo(2,3- <i>g</i>)indol-1-il]etil]asetamid
GTP:	Guanozin trifosfat
GSH-Px:	<i>Glutathione peroxidase</i>
HDL:	<i>High density lipoprotein</i>
Hiomt:	Hidroksiindol- <i>o</i> -metiltransferaz
HUVEC:	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IBMX,	İzobutilmetilksantin
IHK7:	<i>N</i> -Bütanoil-2-(2-metoksi-6 <i>H</i> -isoindolo[2,1]indol-11-il)etanamin
IP3:	Inositol-1,4,5-trisfosfat
IUBMB:	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
KCl:	Potasyum klorür
K ⁺ ATP-kanalı:	ATP-bağımlı K ⁺ kanalı
K185:	<i>N</i> -Butanoil-2-(5,6,7-trihidro-11-metoksibenzo[3,4]siklohept[2,1- <i>a</i>]indol-13-il)etanamin
KH ₂ PO ₄ :	Potasyum hidrojen fosfat
LDL:	<i>Low density lipoprotein</i>
Luzindol:	2-Benzil- <i>N</i> -asetiltriptamin
mM:	Milimolar
M:	Molar
Melatonin:	5-Metoksi- <i>N</i> -asetiltriptamin
MeSH:	Medical subject headings
MDA:	Malondialdehit
MgSO ₄ :	Magnezyum Sülfat
MLT:	Melatonin
mRNA:	Mitokondrial ribonükleik asit
MÖD:	Median ön beyin demeti
MPTP:	1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MT:	Melatonin
MT1-R, MT2-R:	Melatoninin MT1- and MT2-reseptörü
MT1:	Melatonin reseptörü 1
MT2:	Melatonin reseptörü 2

MT3:	Melatonin reseptörü 3
MTT:	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)
N:	Normal
NaCl:	Sodyum klorür
NADPH:	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NaHCO ₃ :	Sodyum bikarbonat
NAS:	N-asetilserotonin
NIH:	<i>National Institute of Health</i>
NO:	Nitrojen monoksit
O.d.:	Ortalama değer
Ort.:	Ortalama
OTC:	<i>Over the counter</i>
PBS	Fosfat tamponlu izotonik tuz çözeltisi
PDE:	Fosfodiesteraz
PGF _{2α} :	Prostaglandin F _{2α}
pH:	<i>Power of hydrogen</i>
Phe:	Fenilefrin
PKA:	Protein kinaz A
PKC:	Protein kinaz C
PKG:	Protein kinaz A, C, ve G
PLC:	Fosfolipaz C
PIP ₂ :	Fosfotidilinozitol 4,5-bisfosfat
PVN:	<i>Paraventricular Nucleus</i>
RORa:	Çekirdekte yer alan transkripsiyon faktörü RORa
RORb:	Çekirdekte yer alan transkripsiyon faktörü RORb
RORc:	Çekirdekte yer alan transkripsiyon faktörü RORc
SHR:	Spontane olarak hipertansif
SNP:	Sodyum nitro prussid
SOD:	Superoksit dismutaz
Std:	Standart
STZ:	Streptozotosin
S20928:	<i>N</i> -[2-Naft-1-il-etil]-siklobütil karboksamid;
S20098:	<i>N</i> -[2-(7-Metoksi-1-naftalenil) etil]asetamid;
S26131:	<i>N</i> -(2-{7-[3-({8-[2-Asetilamino)etil]-2-naftil}oksi)propoksi]-1 naftil}etil)asetamid

SCN:	<i>Suprachiasmatic Nucleus</i>
SCG:	<i>Superior servical ganglion</i>
TG:	Trigliserit
VSCC:	Voltaj-Bağımlı K ⁺ Kanalı

GİRİŞ ve AMAÇ

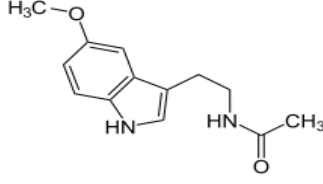
Başlıca pineal bezde sentezlenen melatonin, serebral etkileri yanında periferik etkiler de göstermektedir (Wiswanathan ve ark., 1990). Melatonine ait periferik etkiler oküler, immünolojik ve reproduktif sistemler üzerinde görüldüğü gibi vasküler sistemde de görülmektedir ancak melatoninin vasküler etkilerinin değerlendirildiği detaylı çalışmalar kaudal arter ve serebral arter gibi belirli damar yataklarıyla sınırlı kalmıştır.

Melatonin hücre içi etkilerini, sitozolik membranda yer alan G protein bağlı melatonin reseptörleri MT1 ve MT2 reseptörü üzerinden göstermektedir. Melatonin lipofilik yapısına bağlı olarak hücre içine difüze olduğu durumlarda ise *retinoid Z receptor* (RZR) ve *retinoid acid receptor-related orphan receptor* (ROR) ailesinden olan nükleer reseptörler aracılığıyla transkripsiyonel etkiler ortaya çıkarmaktadır (Chowdhury ve ark., 2008). Melatonin ayrıca, daha önceleri MT3 reseptörü olarak adlandırılmış olan ancak daha sonra bir çeşit kinon redüktaz olduğu anlaşılan; kinon redüktaz II (QR2) enzimine kofaktör olarak bağlanır (Slominski 2012). Gün içinde melatonin verildikten sonra vücudun distal bölgelerinde vazodilatasyon oluşması sebebiyle, vücut sıcaklığı düşmektedir, ayrıca pinealektomi deneysel hipertansiyon oluşmasına neden olmaktadır. Tam olarak hangi reseptörlerin melatonin ile oluşan vasküler etkilere aracılık ettiği araştırılması gereken konulardan biridir (Pandi-Perumala ve ark., 2008).

Sıçan aortasında mRNA ve protein düzeyinde yalnız MT1 reseptörünün bulunması ve MT2 reseptörünün bulunmaması, yine sıçan aortasında MT1 reseptörünün protein düzeyinde yalnız *Tunica adventida*'da yani damar yatağında en iç tabakada olan endotelde yoğunlaşması (Schepelmann ve ark., 2011) sebebiyle ayrıca MT1 selektif bir antagonistin bulunmadığı da düşünülecek olursa endoteli sağlam sıçan aortası melatoninin MT1 reseptörü üzerinden meydana getirdiği etkilerin değerlendirilmesi bakımından çok güzel bir model oluşturmaktadır. Bu amaçla endoteli sağlam sıçan aortasında melatonin (10^{-5} M) inkübasyonu, potasyum klorür (KCl), fenilefrin (Phe), asetilkolin (Ach) ve sodyum nitro prussid (SNP) ile oluşan yanıtlar bakımından kontrol ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Melatoninin etkisi endotelsiz aortada gevşeme yanıtları bakımından da araştırılmıştır. Endotelsiz aortada, melatonin inkübasyonundan sonra Ach ve SNP yanıtları kontrol ile kıyaslanmıştır. Bu deneylerde melatoninin etkisinin ortaya çıkmasında rol oynaması muhtemel antioksidan etkileri bertaraf edip yalnız MT1 reseptörünün rolünü araştırmak amacıyla, MT1 reseptör antagonisti luzindol ile aynı deneyler tekrarlanarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Melatoninin etkisinin ortaya çıkmasında önemli rol oynadığını düşündüğümüz endotel tabaka üzerinde deney yapabilmek amacıyla HUVEC hücresi temin edilmiştir. HUVEC hücreleri ile yaptığımız araştırmalarda melatonin; sitotoksisite, nitrik oksit (NO) miktarının bir göstergesi olan total nitrit/nitrat miktarı ve kalsiyum miktarı bakımından değerlendirilmiştir. Melatoninin bu etkilerine hangi melatonin reseptörlerinin aracılık ettiğini bulmak amacıyla melatoninin yanı sıra MT1/MT2 reseptör antagonisti luzindol; selektif MT2 reseptör antagonisti 4P-PDOT; ve MT3 reseptör agonisti (veya QR2 enzim ligandı) olan GR135531 (5-MCA-NAT) ile inkübasyonlar yapılarak aynı deney prosedürü tekrarlanmış ve sonuçlar melatoninin tek başına gösterdiği etki ile kıyaslanmış ve hangi melatonin reseptörlerinin bu etkilerden sorumlu olduğu gösterilmiştir.

KAYNAK BİLGİSİ

Melatoninin Keşfi



Şekil 1. Melatoninin Kimyasal Yapısı. Kimyasal Olarak *N*-[2-(5-Metoksi-1*H*-İndol-3-il)Etil]Ethanamid Olarak Adlandırılmaktadır (IUPAC), Kapalı Formülü $C_{13}H_{16}N_2O_2$ ve Molekül Ağırlığı 232.278 g/mol'dür ([http-1](http://1))

1917'de McCord ve Allen isimli iki bilim cilt hastalıklarına çare olabileceğini düşünerek sığır pineal bezinden elde ettikleri bir ekstreyi *Rana pipiens* iribaşlarının bulunduğu suya eklemiş ve iribaşların deri renklerinin açıldığını gözlemlemişlerdir (McCord ve Allen, 1917). Lerner ve ark., (1959) ise melatoninin sığır pineal bezinden izole etmiş ve kurbağa derisinin parlamasına bu maddenin neden olduğunu göstermişlerdir. Aynı yıl melatoninin kimyasal bileşimi *N*-asetil-5-metoksitripamin olarak aydınlatılmış ve bir α -melanosit stimule edici hormon (α -MSH) antagonisti olarak davrandığı gösterilmiştir (Lerner ve ark., 1960). Melatoninin ilk önce tanımı "*melanophore contracting hormone*" olarak yapılmış fakat daha sonra melatonin ismi; kurbağa derisindeki melanoforların beyaz görünüşüne neden olduğu için "mela-" ön eki ile, serotonininden türediği için "-tonin" son eki birleştirilerek oluşturulmuştur (Şener, 2010).

Karanlığın Hormonu: Melatonin

Karanlığın hormonu olarak bilinen melatonin, sirkadien bir ritimde geceleri yüksek miktarda olacak şekilde pineal bezde sentezlenir (Dubocovich ve ark., 2003). İnsan serum seviyeleri karanlıkta $3,2 \times 10^{-10}$ M, aydınlıkta ise $8,2 \times 10^{-11}$ M civarındadır. İnsanlar gibi diurnal (gündüz aktif) canlılarda da, sıçanlar gibi nokturnal (gece aktif) canlılarda da salgılanması karanlıkta artar, ışığa maruziyette azalır (Omroe ve ark., 1998).

Melatoninin yaşayan sistemlerde çok yaygın oluşu, dünyadaki en primitif ve en temel biyolojik sinyallerden biri olduğu fikrini uyandırmaktadır. Bakteriler, tek hücreliler, ökaryotlar, bitkilerin kök, gövde, çiçek ve tohum gibi farklı bölümleri dahil canlı organizmalara ait bütün majör taksonlarda tanımlanmıştır. İnsanlarda başlıca pineal bezde sentezlenen melatonin, çeşitli hayvan türlerinin farklı dokularında; harderian bezinde, ekstraorbital lakrimal bezde, retinada, kemik iliğinde, plateletlerde, lenfositlerde, deride, gastrointestinal bölgenin enterokromafin hücrelerinde ve safrada bulunur (Chowdhury ve ark., 2008).

Melatoninin karanlıkta daha fazla salgılanması uyku ile bağlantısını ortaya koymaktadır. Uyku bütün biyolojik prosesler arasında en evrensel olanlardan biridir ve canlılar arasında büyük ölçüde korunmuştur. *Drosophila melanogaster* ve *Caenorhabditis elegans*'dan insana kadar olan bütün canlılar, en azından uykunun bir çeşidini duyumsamaktadır. Bir organizmayı tamamen uykudan yoksun bırakmak son derece tehlikeli hatta ölümcüldür. Uykunun canlılık için gerekli olduğu son derece kabul gördüğü halde pek az aydınlatılabilmiş bir durumdur (Mitchell, 2010). Uyku beynin birçok bölgesi arasındaki karmaşık

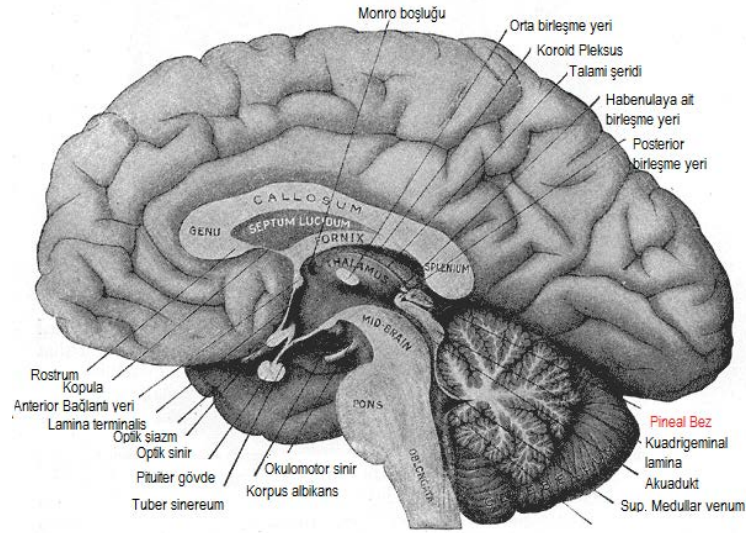
iletifimler ve nöromodülatörler tarafından düzenlenen bir biyolojik iflemdir. Uyku bozuklukları, sağlık ve yaşam kalitesi üzerinde yıkıcı etkiler göstermektedir. Uyku birçok düzenleyici sistem tarafından sıkı şekilde düzenlendiği halde sekonder koşulların veya modern yaşam biçiminin bir sonucu olarak uyku bozuklukları oluşabilmektedir. Nitekim uyku şikayetleri, ağrıdan sonra en fazla ilaç arayışına yönelten rahatsızlıktır. Uyku bozuklukları olarak adlandırılan rahatsızlıklar uykuda geçirilen süreye dayanmaktadır; aşırı uykusuzluk (insomnia) veya aşırı uyku hali (narkolepsi). Bu durumlar bireyin işlerliğini veya konsantrasyon gerektiren işlevlerini yerine getirmesine engel olmaktadır. İşığa bağlı olarak uyarılan melatonin biyosentezi uyku uyanıklık ritmini düzenleyen en önemli faktördür (Mitchell, 2010).

Melatoninin keşfinden bugüne kadar yapılan çalışmalarda, melatoninin sentezi ve salgılanmasında yer alan düzenleyici mekanizmalar, vertebralardaki özellikle insanlardaki farklı vücut fonksiyonlarının düzenlenmesi üzerindeki etkilerinin çeşitli boyutları üzerinde durulmuştur. Özellikle insanlarda olmak üzere farklı canlı türlerinde yapılan çalışmalar, melatoninin, yağlanmadan agresyona, kış uykusundan sirkadien ritime, uykudan strese, doku yenilenmesinden serbest radikallerin yakalanmasına kadar olan birçok fizyolojik fonksiyonun senkronizasyonunda önemli rol oynadığını göstermiştir (Chowdhury ve ark., 2008).

Pineal Bez (*Epiphysis cerebri*)

Melatoninin başlıca sentezlendiği organ olan pineal bezin keşfi İsa'dan önce 300'lü yıllara dayanmaktadır. O dönemde farklı isimler verilmiş olan bu bez, şimdiki adını şekil olarak çam kozalağına (latince *pinealis*) benzemesinden dolayı almıştır. Rene Descartes pineal bezi 'ruhun oturduğu koltuk' olarak tanımlamış ve akıl ve bedenin bağlantı noktası olarak düşünmüş, çam kozalağı şeklinde heykeli Vatikan'da yer bulmuştur ([http 2](http://2)). Pineal bez birçok kaynakta üçüncü göz, akıl gözü veya *chakra* olarak da adlandırılmıştır (Reiter, 1981).

Pineal bez, neredeyse beynin ortasında yer alan bir salgı bezi ve hemostatik regülatördür. Yapısal olarak kırmızı-gri renkte, yetişkinlerde yaklaşık 150 mg ağırlıkta, 8 mm boyunda ve pia mater ile çevrilidir, beyinin üçüncü odacığının (*third ventricle*) posterior kısmında yer alan, *corpus callosum*'un arka bitiş kısmında bulunan bir organdır (Şekil 1; Standring ve ark., 2008; Palaoğlu, 1998). Çokça kan damarıyla çevrili olan pineal bez, böbrekten sonra ikinci en fazla kanlanan organdır (Palaoğlu, 1998; Standring ve ark., 2008). Pineal bezin yaş ile birlikte kalsifikasyona uğraması sık karşılaşılan bir durumdur. İnsanlarda pineal bezin kalsifikasyonu erken yaşlarda başlayabilir ve yaş ilerledikçe artar. 30'lü yaşlarda %70'den fazla oranda kalsifiye olmuş durumdadır (Reiter, 1985). İnsan ömrünün ikinci on yılında pineal bezin ekstraselüler matriksinde oluşan kalkerik depolar 'beyin kumu' (*acervilus cerebri*) olarak adlandırılır (Standring ve ark., 2008; Kuş ve ark., 2002). İnsanda pineal bezin kalsifikasyonu arttikça, fonksiyonel pinealosit sayısı düşmekte, pineal bezin melatonin üretebilme kapasitesi azalmakta, gün içi yorgunluk ve uyku bozuklukları artmaktadır (Kunz ve ark., 1999).



Şekil 2. Pineal Bezin Serebral Konumu (Standring, 2008)

Melatonin Biyosentezi ve Norepinefrin ile Bağlantısı

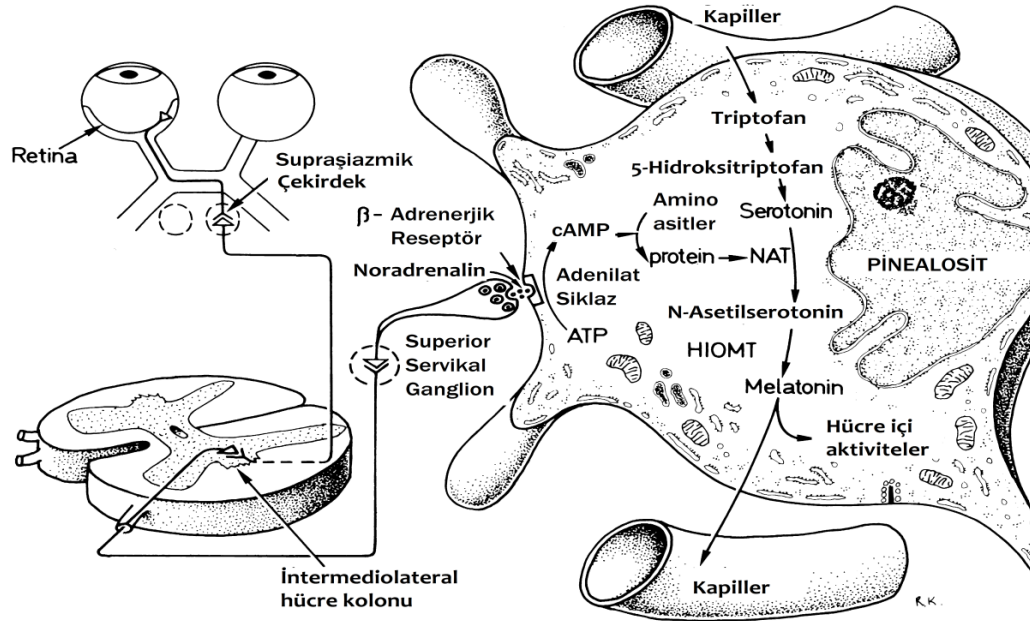
Vücutta başlıca pineal bezde sentezlenen melatonin ışığa bağlı olarak dalgalanan bir salım ritmi gösterir. Bu hormonun pineal bez dışında, retinada bulunan nöroendokrin hücrelerinde, harderian bezlerinde, gastrointestinal bölgede ve pankreasda sentezlendiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Espino ve ark., 2002).

Pineal bezde yer alan, postganglionik adrenerjik sinir uçlarındaki en önemli nörotransmitter norepinefrin'dir. Gün içinde, ışığa maruziyette *nucleus suprachiasmaticus* pineal beze ulaşan sinir uçlarından norepinefrin salınımını etkin olarak durdurur (Kuş ve Sarsılmaz, 2002). Karanlıkta ise sinir uçlarından norepinefrin salınımı başlar. Norepinefrin, pinealosit membranındaki β adrenerjik reseptörleri uyarır. β adrenerjik reseptörlerin uyarılması ile önce adenilat siklaz aktive olur ve cAMP miktarı artar. Daha sonra AA-NAT ve dolayısıyla melatonin sentezi artar. Aydınlıkta ise cAMP ve AA-NAT düzeylerinde hızlı bir azalma gözlenir. Pinealosit membranında NE başlıca β adrenerjik reseptörler üzerinden etki etse de, α -adrenerjik reseptörler de β adrenerjik reseptörlerin uyarımını artırarak NE'in etkisini potansiyelize eder (Kuş ve Sarsılmaz, 2002).

Melatonin biyosentezi sırasında bir aminoasit olan triptofan iki basamakta serotonine (5-hidroksitriptamin, 5-HT) çevrilir, daha sonra melatonin biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan arilalkilamin *N*-asetiltransferaz (AA-NAT) aracılığıyla asetillenir ve oluşan *N*-asetilserotonin, hidroksiindol-*O*-metiltransferaz (HiOMT) ile melatonine dönüştürülür (Şekil 3) (Espino ve ark., 2011).

NE'in uzun zaman genel uyanıklık ile ilgili rolü bilinirken, artık uyku farmakolojisinde de önemli bir rolü olduğu görülmektedir (Mitchell, 2010). Pineal bezde yer alan pinealositlerin membranında bulunan beta ve alfa reseptörler NE aracılığıyla uyarılmakta, daha sonra AANAT ve HiOMT enzimleri aktive olmakta ve melatonin sentezini başlatmaktadır (Chowdhury ve ark., 2008). Norepinefrin (NE) bir nörotransmitter olarak uyanıklık sisteminde yer alsa da uykuyu yada uyanıklığı artıran birçok ilacın etkinliğini değiştirir. Amfetamin gibi uyanıklığı destekleyen ilaçlar ekstraselüler NE seviyesini ve uyanıklığı artıran yolak boyunca

iletimi artırır. Benzodiazepin ve benzodiazepin benzeri uykuyu artıran GABAerjik droglar ise daha spesifik olarak benzodiazepin reseptörlerine etki ederek GABA'nın aktivitesini artırır ki bu da NE transmisyonunu ve uyanıklığı artıran yolağı inhibe eder. NE pinealositler üzerinden uykuyu artırıcı özellik göstermektedir. Histaminlerin uyanıklığı artırıcı etkileri antihistaminikler tarafından bloke olur. Dolayısıyla histamin NE ile birbirlerine ters sinyaller göndermektedir. NE sinyalini etkileyen birçok antidepresan ilaç uykusuzluk tedavisinde de kullanılmaktadır. Melatonin ve benzeri bileşikler de NE uyarımı aracılığıyla beyinde bulunan uyanıklık işlevini yerine getiren nöronlarının aktivitesini baskılar ve uykuyu artıran bir rol oynar (Mitchell, 2010).



Şekil 3. Pineal Bezde Melatonin Sentez Yolağı (Reiter, 1998)

Melatoninin Biyoeliminasyonu

1. Klasik hepatik yıkım yolağı olan ve CYP P₄₅₀ enzimleri CYP_{1A1}, CYP_{1A2} ve CYP_{1B1} ile melatoninin 6-hidroksimelatoninine dönüşmesidir. Bu ürün de sülfat veya glukuronid bağlandıktan sonra üre içine atılır. Karaciğerde melatonin demetilasyon yapan CYP_{2C19} ve CYP_{1A} enzimleriyle N-asetilserotonine de dönüştürülebilir .
2. Alternatif indolik yolak kullanılarak 5-metoksiindol asetik asit (5-MIAA) veya 5-metoksitriptofol (5-MTOL) oluşumu gerçekleşir.
3. Kinurik yolak kullanılarak N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinuramin (AFMK) oluşumu gerçekleşir (Slominski ve ark., 2012). Melatoninin yıkım ürünleri serum melatonin miktarının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Melatoninin Fizyolojik Sistemlere Etkisi

Birçok çalışma sonucunda elde edilen bilgiler melatoninin merkezi sinir sisteminin birçok bölgesinde fizyolojik aktiviteyi etkilediğini göstermektedir. Bunlar *suprachiasmatic nucleus* (SCN), hipokampus, dopaminerjik yolaklar, prefrontal korteks ve serebellumdur. Burada görülen etkileri G protein bağlı membran reseptörleri MT1 ve MT2 aracılığıyla ortaya çıkmaktadır. MT1 ve MT2 reseptörlerinin SCN, hipokampus ve bu bölgelerdeki fizyolojik aktiviteleri

uykunun düzenlenmesini, sirkadien ritimlerin oluşmasını ve belki hafızayı takviye eden etkilerini içine almaktadır. Alzheimer hastalığında beyinde MT1 veya MT2 reseptörlerinin ekspresyonundaki değişiklikler, bu nörodejeneratif bozukluğun patogeneziyle ilişkili olabilir ancak bu hipotez daha fazla klinik ve fizyolojik çalışmayla desteklenmelidir. Mezolimbik dopaminerjik sistemde melatonine bağlı reseptör aracılı cAMP üzerinde oluşan etki bağımlılık davranışlarının düzenlenmesinde yer alabilir. Melatonin reseptörlerinin parkinsonizm ve depresyondaki fizyopatolojik önemi araştırma konularından biridir (Pandi-Perumala ve ark., 2008).

Gözde MT1 reseptörleri fototransdüksiyonda rol oynamaktadır. Fonksiyonel melatonin reseptörlerinin gözde yaygın olarak dağılmış olması, melatoninin oküler gelişim, aköz hümör sekresyonu ve daha ileri seviyede glokomdaki önemine işaret etmektedir (Pandi-Perumala ve ark., 2008).

Her iki melatonin reseptörü hem sağlıklı insan koroner damarlarında hem de kalp hastalığı olan hastaların koroner damarlarında bulunmaktadır. Buna ilaveten periferik damar yataklarında da bulunur, insanlarda melatonin kan basıncını düşürücü etkilere aracılık ettiği düşünülmektedir fakat bu konu aydınlatılmayı beklemektedir (Pandi-Perumala ve ark., 2008).

Meme kanseri hücrelerinde (MCF-7), melatonin ile görülen onkostatik etkilere MT1, MT2 ve ROR α reseptörleri aracılık etmekte ayrıca melatonin ile gözlenen *in vivo* immünomodülatör ve antioksidan etkiler antikanser etkiyi pekiştirmektedir. Melatoninin prostat kanserinde onkostatik etkilerinin olduğu öne sürülmüştür. Melatonin androjen reseptörleri ile ortaya çıkan etkileri, hücre çekirdeğinden bu reseptörleri uzaklaştırarak göstermektedir (Pandi-Perumala ve ark., 2008).

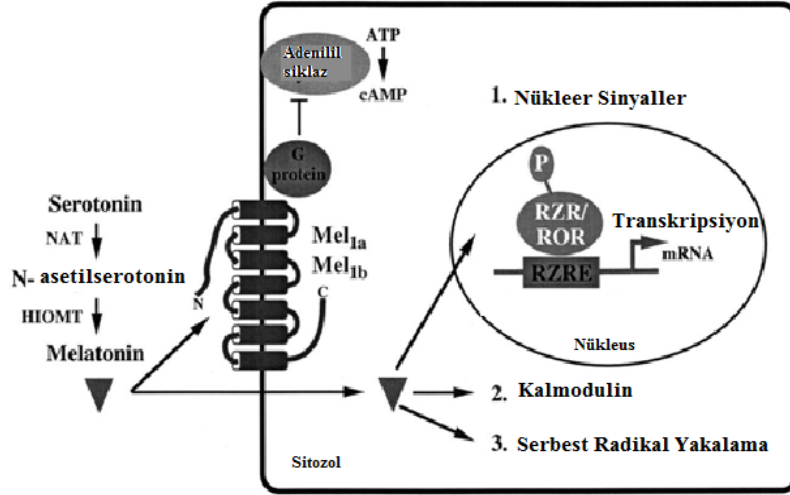
Melatoninin bağlandığı membran ve çekirdek reseptörlerinin hepsi hücreSEL ve humoral immün sistem içinde yer almaktadır. Melatonin lenfo-monositlerde IL-2 ve inflamatuvar sitokin üretimini melatonin reseptörleri aracılığıyla artırmakta, bu yolla melatonine bağlı onkostatik etkilere de yer almaktadır (Pandi-Perumala ve ark., 2008).

Melatonerjik reseptörlerinin insan derisinde dağılımı deriyi koruyucu bir rol üstlenmektedir. Bazı veriler melatonin reseptörlerinin melanoma ve saç büyümesini kontrol ettiğini göstermektedir (Pandi-Perumala ve ark., 2008).

Melatonerjik sistemde görülen disfonksiyonların, erişkinlerde Alzheimer, parkinson, glokom, depresyon, meme ve prostat kanseri, hepatoma, melanoma ve hipertansiyon gibi birçok rahatsızlığın oluşmasına katkı sağlayabilir (Pandi-Perumala ve ark., 2008).

Bu hormon biyolojik ritimlerin oluşmasına yardımcı olur, terapötik konsantrasyonlarda uyku bozuklukları ve *jetlag* gibi durumların onarılmasında, körlük ve vardiyalı çalışanlarda görülen sirkadian ritim senkronizasyon bozukluklarını düzeltmek amacıyla, kanser gelişimini önleyen etkileri dolayısıyla kanser tedavisine ek olarak, Alzheimer'ın ve diğer nörodejeneratif bozuklukların ilerlemesini engellemek amacıyla kullanılmaktadır (Kostoglou-Athanassiou, 2013).

Melatonine Bağlı Uyarılan Hücre İçi Mekanizmalar



Şekil 4: Melatonin ile Oluşan Hücre İçi Cevaplar (Carlberg, 2006)

Melatoninin biyolojik fonksiyonlarını ve muhtemel kullanım alanlarını tespit için yapılmış araştırmalar temelde hücre içinde meydana gelen değişiklikler neticesinde ortaya çıkmaktadır. Bunun için melatoninin hücre içi sinyal yolağını aktive eden mekanizmada rol oynayan MT1 ve MT2 melatonin reseptörlerine, ayrıca lipofilik bir molekül olarak hücre içine doğrudan girdikten sonra bağlanabileceği kinon redüktaz II enzimine ve ROR/RZR çekirdek reseptörlerine değinilmiştir.

Melatonine Ait Antioksidan Özellikler ve MT3 Reseptörü (Kinon Redüktaz 2)

Melatoninin lipit çözünürlüğü yüksek, suda çözünürlüğü düşüktür. Melatonin lipofilik bir molekül olarak bütün hücrelere, dokulara ve organlara girebildiği için oksidatif stres durumunda reseptörden bağımsız ve hormonal olmayan serbest radikal yakalayıcı etkiler de göstermektedir (Chowdhury ve ark., 2008).

Melatonin hücre içine hızlıca nüfuz ederek, lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan genetik hasardan DNA'yı korumaktadır. Malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksialkenal (4-HDA) ve membran lipid peroksidasyon metabolitlerini azaltarak, lipoperoksidatif hasara karşı koruyucu özellik gösterdiği iskemi reperfüzyon çalışmalarıyla ortaya konmuştur (Ortiz ve ark., 2008).

Melatonine oksijen radikallerinin varlığında transfer olan bir elektronla indolil katyon oluşur ve metaboliti kinuramine dönüşür. LPS, paraquat ve diquat verilmeden önce melatonin uygulamasının karaciğer hasarına karşı koruyucu olduğu, ayrıca lipid peroksidasyonuna neden olan karbon tetraklorid (CCl₄)'in etkisini önlediği *in vivo* olarak, rat beyin homojenizatlarına melatonin varlığında kainat ve hidrojenperoksid verildiğinde lipid hasarının azaldığı *in vitro* olarak görülmüştür. Melatoninin bu etkisi konsantrasyon bağımlı olarak ortaya çıkmaktadır (Ortiz ve ark., 2008).

Melatoninin lipid peroksidasyonunu önlerken ortaya koyduğu bazı karakteristik özellikler şöyle sıralanabilir:

- 1) Yağda çözünürlüğü yüksektir
- 2) Lipid peroksidasyonunu başlatabilecek düzeydeki OH radikallerini yakalar

- 3) Vitamin E ve C gibi antioksidanların etkinliğini artırır
- 4) *Singlet* reaktif oksijeni ve peroksil radikallerini yakalayabilir
- 5) Glutasyon peroksidaz ve superoksit dismutaz aktivitesini artırır.
- 6) Bazı diğer durumlarda da melatoninin nöroprotektif etkileri görülmüştür:
 - a)Hiperbarik oksijene maruziyetin oksidatif etkilerinde
 - b)Geçici serebral iskemi reperfüzyon durumlarında
 - c)Morfolojik bariyerlerden ve subselüler komponentlerden kolayca penetrasyonu sağlaması dolayısıyla
 - d)Sıçanlarda etanol, indometazin ve asetik asit ile oluşturulan gastrointestinal lezyonlarda
 - e)MPTP ile oluşturulan hipokampus ve striatum lezyonlarında.

Ayrıca serumda bulunan melatonin seviyesinin düşmesine neden olan pinealektomi, yaşlılıkta görülen mikrozomal membran sertleşmesini artırmaktadır (Ortiz ve ark., 2008). Gece ışığa maruziyet sonucu melatonin seviyelerinin azalmasına bağlı olarak yaşlılık belirtilerinin oluşması, melatoninin *anti-aging* özellik gösterdiğini düşündürmektedir (Carlberg, 2006).

Melatonin uygulamasından sonra STZ verilmesi sıçanlarda diabet oluşumunu önlememiştir. Diabet oluşumu sağlıklı kontrollere göre, sıçanlarda serum GFAP ve S-100B değerlerini artırır. Melatonin uygulaması diabetik sıçanların serebellum, korteks ve hipokampuslerindeki GFAP ve S-100B değerlerindeki artışı azaltmıştır. Bu sonuçlar melatoninin diabette artan oksidatif strese bağlı etkileri engellediğini göstermektedir (Baydas ve ark., 2003a ve 2003b). Melatonin STZ ile diabet oluşturulduktan sonra artan plazma TBARS (lipit peroksidasyonu için bir belirteç) ve total sialik asit seviyeleri geri çevirmiştir (Görgün ve ark., 2002).

Melatonin ve onun prekürsörü olan N-asetilserotoninin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda demir ve LPS ile indüklenen lipit peroksidasyonunu sıçan ve farelerde azalttığı gösterilmiştir, ayrıca bu etkiler melatonin antagonistleri olan luzindol (yarışmalı MT1/MT2 antagonisti), DH 97 (MT2 antagonisti), prazosin (MT3 antagonisti), and 4P-PDOT (MT2 antagonisti) varlığında tekrarlanmış ve MDA seviyeleri değişmediği ortaya konmuştur dolayısıyla melatonin ile görülen antioksidan etkiler melatonin reseptörlerine bağlı olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Ancak ilginç olarak luzindol tek başına, 50 M konsantrasyonda demirle oluşturulan MDA seviyesini %80, LPS ile oluşturulan MDA seviyesini %85 azaltmıştır. 800 µM konsantrasyonda ise lipit peroksidasyonunu, MDA seviyesini kontrol grubundaki miktara çekerek önlemiştir. (Requintina ve Oxenkrug, 2007).

Melatoninin oksijen ve nitrojen kökenli radikalleri yakaladığına dair çok fazla kanıt bulunmaktadır. Ayrıca SOD ve GSH-Px gibi antioksidan özellikteki enzimleri desteklemektedir. Melatoninin vitamin E ve sarımsak yağından daha iyi antioksidan özellikler gösterdiği bulunmuştur. Hiperglisemik koşulların olduğu inflamatuvar durumlarda, hücrenin kaderini belirlemede ONOO⁻ önemli rol oynamaktadır. NO ve .O₂ bir kere ONOO⁻ radikali oluşturmak üzere birleştiğinde vitamin E, vitamin C veya diğer geleneksel antioksidan maddelerle yok edilmesi mümkün olmamaktadır. Melatonin ve metabolitlerinin ise bilinen antioksidanlardan farklı olarak iNOS inhibisyonu yapan ve ONOO⁻ yakalayan özellikte olduğu görülmüştür. Merkaptotetilguanidin ve ebselen gibi moleküllerin deneysel olarak iNOS baskılayıcı ve ONOO⁻ yakalayıcı özellikleri gösterilse de melatonininden farklı olarak insanda kullanılamamaktadır. Melatoninin

inflamasyonu TBF- α ve IL-1 gibi transkripsiyon faktörlerini bloke ederek de hafiflettiği gösterilmiştir (Korkmaz ve ark., 2008).

Melatoninin antioksidan özellik göstermesinin aydınlatılan sebeplerinden biri QR2 enzimidir. Melatoninin sitozolik bağlanma bölgesi önceleri MT3 reseptörü olarak adlandırılmış fakat daha sonra bu yapının bir reseptörden çok enzim özelliği gösterdiği görülmüş ve kinin redüktaz 2 enzimi (QR2, EC 1.6.99.2 daha sonra EC kodu EC 1.6.5.2) olarak adlandırılmıştır (Nosjean ve ark., 2000). Kinin redüktaz 2; kininlere elektron transferini önleyerek oksidatif strese karşı koruyucu özellik gösteren bir redüktazdır. Melatonin ise bu enzimin kosubstratı olarak düşünülmektedir. Melatonin kosubstrat bağlanma bölgesine bağlandıktan sonra enzimin kofaktörü olan flavin adenin dinükleotid'e (FAD) bir elektron vererek N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin ve/veya 3-hidroksimelatonine dönüşür. QR2 detoksifiyan ve antioksidan bir enzim olarak düşünülmekte ve kosubstrat mevcudiyetine bağlı olarak davranışı değişmektedir. Melatonin vücutta sentezlenen fakat aydınlık/karanlık, gençlik/yaşlılık, hastalık/sağlık durumuna bağlı olarak miktarı değişen bir moleküldür. Dolayısıyla değişen melatonin miktarı QR2 enziminin aktivitesini etkilemektedir .

Melatoninin Bağlandığı Çekirdek Reseptörleri: RZR/ROR α , RZR β

Melatonin ayrıca retinoid bağlantılı nükleer hormon reseptörleri (RZR/ROR α , RZR β)'nin de ligandıdır.

Melatonin birbirine çok benzeyen iki nükleer reseptör olan RZR/ROR α and RZR β 'e bağlanır ve onları aktive eder. Bu nükleer reseptör süperailesi bugün sırasıyla NR1F1 ve NR1F2 adıyla da anılmaktadır. Nükleer reseptörler gen transkripsiyonunu, 'cevap elementleri' adı verilen hedef genlerinin promoter bölgelerinde yer alan özel DNA dizilerine bağlanarak düzenlerler. Bu yüzden her bir nükleer reseptöre ait cevap elementinin karakterize edilmesi önemli bilgiler elde edilmesini sağlar. Nükleer reseptörler süperailesi içinde RZR/ROR α ve RZR β ; DNA'ya monomer olarak bağlanan az sayıdaki reseptörden ikisidir (Carlberg, 2006). (Bazı kaynaklar dimer halinde de bağlandığını göstermektedir). Serumda yer alan bileşiklerin bir şekilde RZR/ROR'u etkilediği bilinmektedir. RZR/ROR'a ait yapısal aktivitenin düşük olduğu durumlarda bir tiazolidindion olan CGP52608 (1-[3-allil-4-okso-tiazolidin-2-iliden]-4-metil-tiosemikarbazon)'un nanomolar konsantrasyonlarda RZR/ROR α 'yı aktive ettiği görülmüştür. Tiazolidindionlar gibi melatonin de nanomolar konsantrasyonlarda RZR/ROR α ve RZR β 'yı aktive etmektedir (Carlberg, 2006). Melatonin ile insülin arasında bir antagonizma olduğu da görülmektedir (Peschke ve ark., 2007; Peschke ve ark., 2010; Perschke ve ark., 2011).

Melatonine bağlı görülen antikanser ve antiproliferatif etkilerin bu reseptörler aracılığıyla ortaya çıktığına dair kanıtlar bulunmaktadır (Carlberg, 2006). Örneğin melatoninin antikanser etkisi, RZR/ROR α antagonisiti ile bloke edilebilmektedir (Winczyk ve ark., 2002).

ROR α , β ve γ steroid hormon reseptörleri süperailesine mensuptur.

ROR α : Serebellumun gelişimi özellikle purkinje liflerinin farklılaşması ve granül hücre progenitörlerinin proliferasyonu düzenlemektedir. Ayrıca kemik dokusunun devamlılığının sağlanmasında etkili olduğu belirtilmektedir. ROR α eksik farelerin aterosikleroza daha yatkın olduğu görülmüştür.

ROR γ : Lenf nodlarının organogenezinde gereklidir ve lenfoid doku indükleyici (Lti) hücrelerinin devamlılığı ve rejenerasyonunda kilit rol oynamaktadır.

ROR reseptörlerinin sirkadien ritime uygun olarak ekspresyonlarının dalgalandığı görülmektedir. RORb yoksun farelerde sirkadien ritimin değiştiği görülmektedir.

ROR γ yoksun farelerde allerjen ile hava yolu inflamasyonu oluşma ihtimali azalmaktadır.

ROR α yoksun farelerde ise lipopolisakkaritlere verilen inflamasyon cevabı uzamıştır.

ROR α 'ya kolestrol ve türevleri agonist gibi davranmakta, bazı retinoidler ise ROR β ve ROR γ 'ye parsiyel antagonist gibi davranmaktadır (Jetten, 2004).

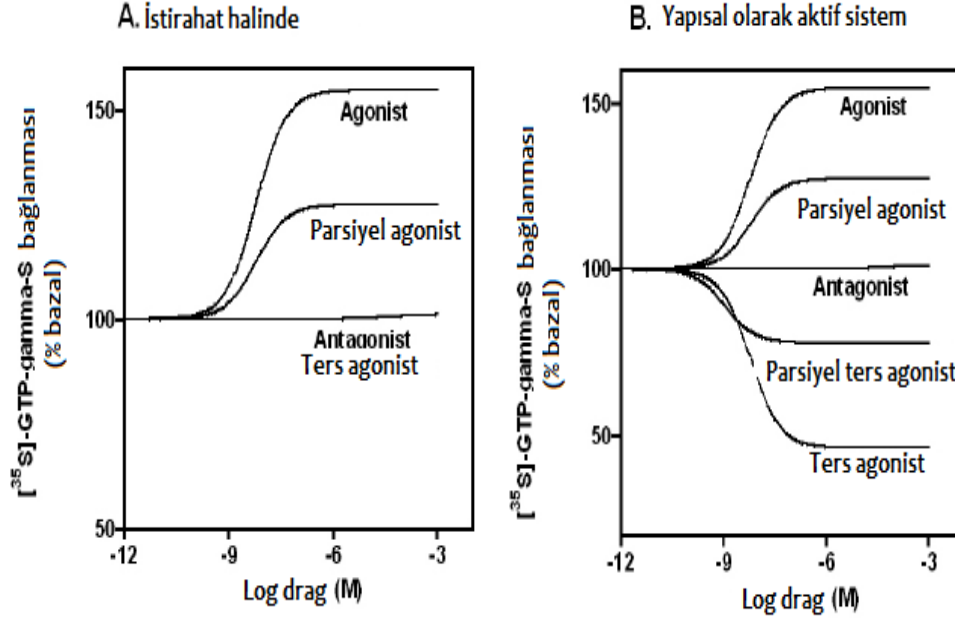
Melatonin Reseptörleri: MT1 ve MT2

Melatonine spesifik ve hücre membranında yer alan reseptörler MT1 ve MT2 olarak adlandırılmaktadır. MT1 ve MT2 reseptörlerinin spesifik, yüksek afiniteli, pertussin toksinine duyarlı, G_i proteinine bağlı yedi transmembranal segmentli reseptörler olduğu gösterilmiştir (Peschke ve ark., 2008). Memelilerde G protein bağlı melatonin reseptör alttipi olan MT1 ve MT2 klonlanmış ve karakterize edilmiştir. ¹²⁵I-melatonine karşı, insan MT2 reseptörü ($K_d=160\text{pmol/l}$), MT1 reseptörüne ($K_d=20-40\text{ pmol/l}$) göre daha az afinite göstermektedir fakat bağlanma karakteristikleri genellikle benzerdir örneğin ikisinde de agonist bağlanması GTP duyarlıdır. MT1 ve MT2 reseptörleri tek tek veya birlikte vücutta bir çok dokuda bulunmaktadır. Fonksiyonel MT1 reseptörleri santral sinir sisteminde, serebellumda, hipokampüste, santral dopaminerjik yollarda, venlerde, testiste, meme bezinde, koroner damarlarda, aortada, karaciğerde, böbrekte, idrar torbasında, deride ve bağışıklık sisteminde bulunurken, MT2 reseptörlerinin dağılımı daha sınırlıdır ve özellikle beyinde yaygın olarak bulunmaktadır, yine de akciğerde, kalpte, aortik ve koroner dokuda, miyometriyumda ve granuloza hücrelerinde, dudenumda ve adipozitlerde bulunmaktadır. MT3 reseptörü yani kinin reduktaz 2 ise akciğerde, karaciğerde, beyinde, kalpte, böbrekte ve kahverengi yağ dokusunda ve gözde bulunmaktadır (Pandi-Perumala ve ark., 2008).

Yüksek afiniteli MT1 ve MT2 reseptörleri pertussis toksinine duyarlı G proteinlere bağlıdır ve adenilil siklaz aktivitesini inhibe ederler. Yalnızca %60 oranında aminoasit benzerliği gösteren ve farklı kromozomlardan kodlanan reseptörlerdir. Bu reseptörler sırasıyla 350 ve 362 aminoasit uzunluğundadır ve hesaplanan moleküler ağırlıkları 39-40 kDa kadardır. MT1 ve MT2 reseptörlerinin N terminallerinde sırasıyla iki ve bir potansiyel glikozilasyon bölgeleri bulunur. Aminoasit dizilişleri ve protein-protein etkileşimleri incelendiğinde ligand algulamak için farklı bağlanma bölgelerinin oluşmasına neden olan farklı yapısal özellikler gösterdikleri görülmektedir (Dubocovich ve ark., 2003).

Melatonin reseptörlerinin karakterlerinin tespit edilebilmesi için bu reseptöre ait ligandların ve radyoligandların farmakolojik özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Ligand etkinliği; reseptörün bulunduğu hücrede meydana getirdiği değişiklikler olarak tanımlanabilir. Ligandlar etkinliklerine göre sınıflandırılırlar 1) tam positif etkinlik göstererek hücre içi cevaba yol açan agonistler 2) sıfır etkinliğe sahip ve hücre içi cevap oluşturmayan nötr antagonist 3) agonistin tersine, negatif etkinlik oluşturan ters (*inverse*) agonistler. Örneğin istirahat durumunda bir agonist radyoaktif G proteinlerine GTP bağlanmasını artırırken

inverse agonist ve antagonist GTP bağlanmasını değiştirmez, fakat yapısal olarak aktif sistemde agonist GTP bağlanmasını artırırken, antagonist GTP bağlanmasını değiştirmez, *inverse* agonist ise GTP bağlanmasını azaltır (Dobocovich ve ark., 2003; Şekil 4)

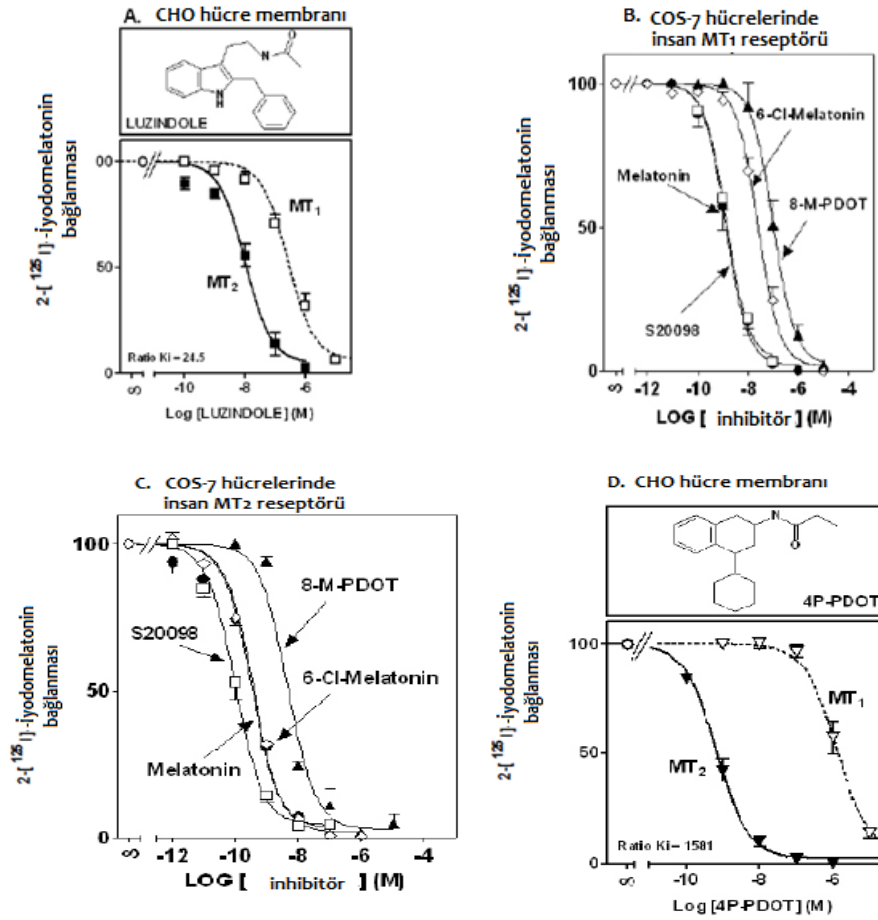


Şekil 5: Yapısal Aktivite Üzerindeki Ligand Etkinliği. Şematik Olarak G Proteinlerine ³⁵S-GTP-Gama-S Bağlanması Gösterilmiştir. A. İstirahat Halindeki Sistemlerde B. Üzerinde Çalışılan Reseptörün Yapısal Olarak Aktif Olduğu Sistemlerde Ters Agonist ve Parsiyel Ters Agonistler Radyoaktif GTP Bağlanmasını Denge Durumundan Aşağıya Çekerek Reseptörden Radyoaktif GTP'nin Ayrılmasına Neden Olur (Dubocovich ve Ark., 2003).

Melatoninin ligand olarak etkinliğinin belirlendiği *in vitro* farmakolojik ölçümler, retinadan kalsiyum bağımlı dopamin salımı, amfibiotiklerden deri melanoforlarında pigment birikiminin ölçülmesi, beyin kesitlerinde sirkadian ritimdeki nöronal ateşlemelerin faz kaymaları, GTP-değişimi ölçümleri, radyoaktif GTP nin G proteinlere bağlanması şeklinde sıralanabilir (Dubocovich ve ark., 2003).

Melatonin ve luzindol MT1 ve MT2'ye selektivite bakımından değerlendirildiğinde, luzindolün K_i MT1 / K_i MT2 selektivite oranı 15 ila 26 arasında, melatoninin K_i MT1 / K_i MT2 selektivite oranının 4,9 civarında olduğu görülmektedir. Selektivite bir ilacın aynı sınıftan bir reseptöre diğerine göre daha fazla afiniteyle bağlanmasıdır ve bir reseptörle diğeri arasındaki fark ortaya konmak istendiğinde o reseptöre selektif ligand veya antagonist seçilir. Bir ligand, oran olarak bir reseptöre diğerinden 100 veya daha fazla kat afiniteyle bağlanıyorsa o ligand selektif kabul edilir. Örneğin 4P-PDOT MT2 reseptörüne selektiftir çünkü K_i MT1 / K_i MT2 selektivite oranı 300 ila 1500 arasındadır (Dubocovich ve ark., 2003). Bu tezde melatonin reseptörlerinin vazoreaktif yanıtlara etkisi değerlendirilirken melatonin ve luzindol kıyaslanmıştır. Sıçan aortasında yalnız MT1 reseptörü varlığı gösterildiğinden aorta deneylerinde 4P-PDOT kullanılmamış (Schepelmann ve ark., 2011) ancak HUVEC ile yaptığımız

hücre kültürü deneylerinde luzindolün yanı sıra 4P-PDOT da kullanılarak MT2 reseptörünün etkinliği değerlendirilmeye çalışılmıştır.



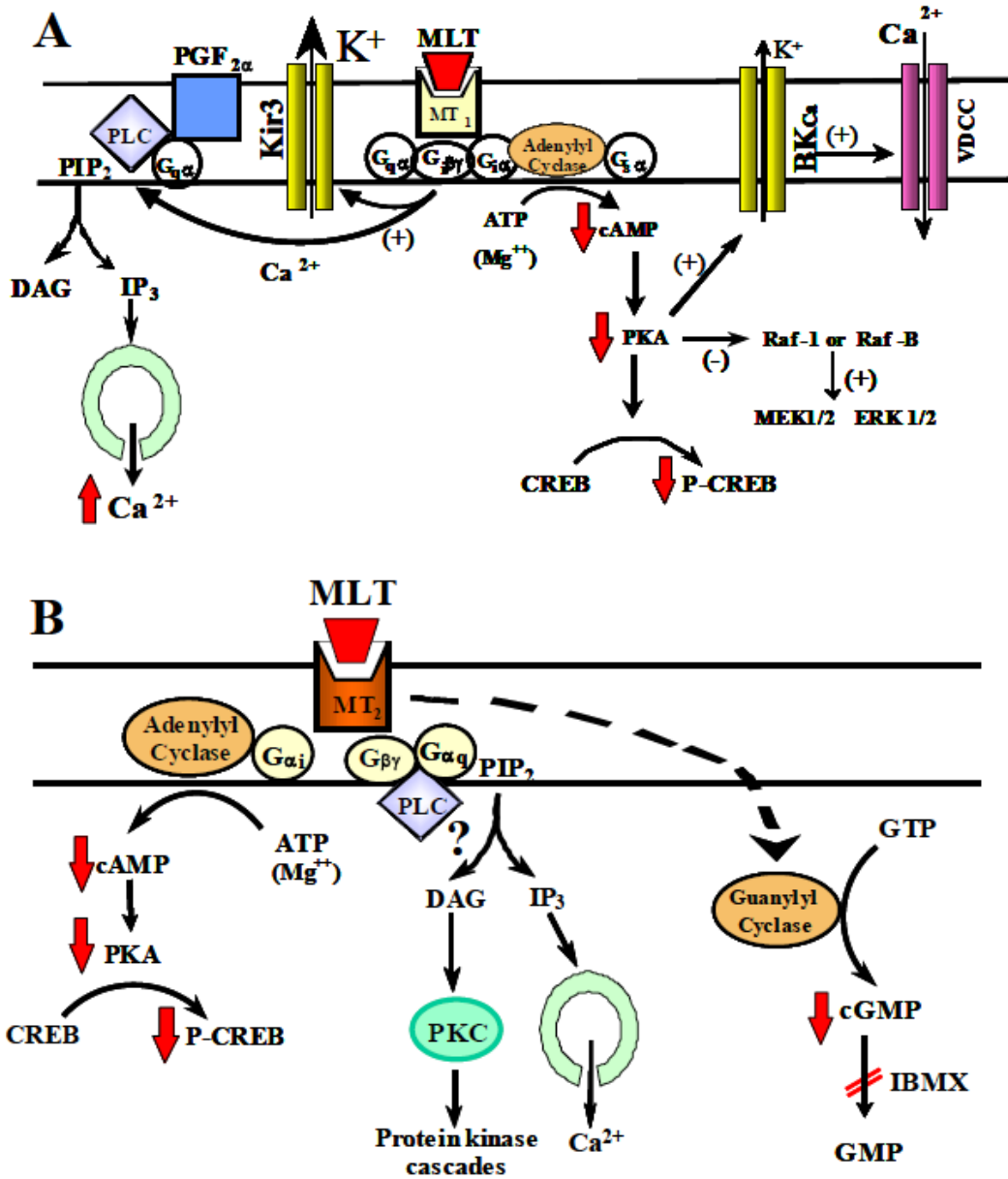
Şekil 6. Radyoaktif İyodomelatoninin Bağlanmasını Azaltan Ligand Aktiviteleri A. Luzindolün Rekombinant İnsan MT1 veya MT2 Reseptörü Eksprese Eden CHO (*Chienese Hamster Ovary*) Hücrelerinde MT1 ve MT2 Reseptörlerine Bağlanma Sırasında 2-(¹²⁵I) İyodomelatoninini Kovma Yüzdeleri, B. ve C. Çeşitli Antagonistlerin Rekombinant İnsan MT1 veya MT2 Reseptörü Eksprese Eden COS-7 Hücrelerinde 2-(¹²⁵I) İyodomelatoninini Kovma Yüzdeleri, D. 4P-PDOT'un Rekombinant İnsan MT1 veya MT2 Reseptörü Eksprese Eden CHO Hücrelerinde MT1 ve MT2 Reseptörlerine Bağlanma Sırasında 2-(¹²⁵I) İyodomelatoninini Kovma Yüzdeleri (Dubocovich ve ark., 2003).

Melatonin reseptörlerine ait sinyal iletim yolları rekombinant MT1 ve MT2 reseptörleri sentezleyen memeli hücrelerinde ortaya konmuştur.

MT1 reseptörleri hem pertussis toksinine duyarlı hem de pertussis toksinine duyarlı olmayan yollarla birçok hücre içi cevap oluşturur. MT1 reseptörü uyarıldığında G_i (G₁₂ ve G₁₃) proteinleri vasıtasıyla forskolinle uyarılan cAMP oluşumu, protein kinaz A aktivitesi ve cAMP cevap elementinin (CREB) fosforilasyonu baskılanır. MT1 ayrıca G_q proteinleri vasıtasıyla fosfotidil inositol döngüsünü ve hücre içi kalsiyumu artırır. Ayrıca MT1 reseptörünün aktivasyonu hem pertussis toksinine duyarlı (G_i) hem de duyarlı olmayan (G_s, G_z ve G₁₆) proteinler aracılığıyla c-jun N-terminal kinaz aktivitesini artırır. Bunun dışında MT1 reseptörlerinin aktivasyonu, bu reseptöre bağlı beta-gama alt biriminin

ayrılması yoluyla prostaglandin $F_{2\alpha}$ ve ATP aracılı fosfolipaz C stimülasyonunu artırır. MT1 reseptörü G-protein bağlı içeri doğru düzeltici potasyum kanalından (GIRK) potasyum taşınmasını artırır. İlâveten MT1 aktivasyonu MEK₁₋₂ ve ERK₁₋₂ fosforilasyonunu ve fosfoinosit hidrolizini artırır (Dubocovich ve ark., 2003).

Memeli hücrelerinde sentezlenen rekombinant MT2 aktivasyonu ise forskolin ile uyarılan cAMP oluşumunu ve cGMP birikimini baskılar, fosfoinosit hidrolizini artırır. İnsan MT2 reseptörü sentezleyen COS-7 hücrelerinde melatonin pertusis toksinine duyarlı (G_i) ve duyarsız (G_{16}) proteinleri aracılığıyla c-Jun N-terminal kinazı uyarır. MT1 *knockout* fare merkezi sinir sisteminde CREB fosforilasyonunun inhibisyonunun MT2 reseptörleri aracılığıyla oluştuğu görülmüştür fakat mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır (Dubocovich ve ark., 2003).



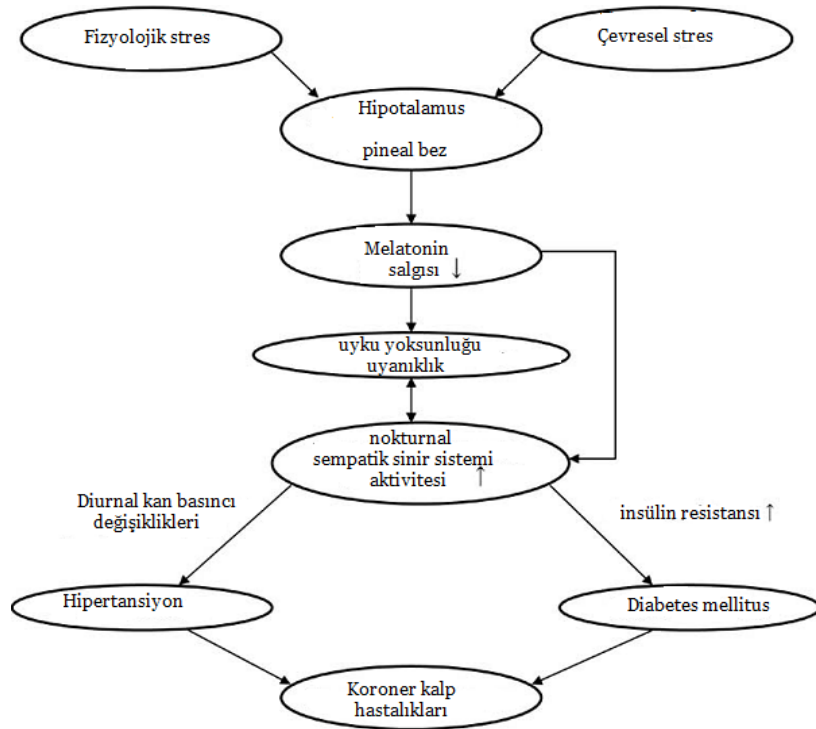
Şekil 7. MT1 ve MT2 Melatonin Reseptörleri ile Aktive Edildiği Düşünülen Sinyal Yolakları, A: G_i And $G_{q/11}$ ile Bağlı MT1 Melatonin Reseptörlerine Ait Çoklu Sinyal Yolakları, B: MT2 Melatonin Reseptor Aktivasyonu ile Harekete Geçen Sinyal Yolakları (Dubocovich ve ark., 2003)

Çizelge 1. Melatonin Reseptörleri, Agonist ve Antagonistleri ve Sinyal İletim Yolakları (Omar ve ark., 2010)

Günümüzdeki ismi	MT1	MT2	MT3 ?
Önceden kullanılan ismi	Mel1a	Mel1b	ML2
	ML1A	ML1B	
	MEL1A	MEL1B	
Yapısal bilgi	350 aa (insan)	363aa (insan)	Bilinmiyor
Tam agonistler	Melatonin (M5250), 2-İyodomelatonin (I1899), N-propionil melatonin, N-butanoil melatonin, 6-Kloromelatonin (C0331)	Melatonin (M5250), 2-İyodomelatonin (I1899), N-propionil melatonin, N-butanoil melatonin, 6-Kloromelatonin (C0331)	2-İyodomelatonin (I1899), 6-Kloromelatonin (C0331), Melatonin (M5250), N-Asetilserotonin (A1824), 5-MCA-NAT (GR135531)
	2-Metil-6,7-dikloromelatonin, S20098, GR 196429, 8M-PDOT, (-)-AMMTC, S26131	2-Metil-6,7-dikloromelatonin, S20098, GR 196429, 8M-PDOT, (-)-AMMTC, IIK7 (I5531)	
Parsiyel agonistler	5-Metoksiluzindol, N-asetiltriptamin (A7342)	5-Metoksiluzindol, N-asetiltriptamin (A7342)	Bilinmiyor
Antagonistler	Luzindol (L2407), S20928	Luzindol (L2407), S20928, 4P-PDOT, 4P-ADOT, K185 (K1888)	Luzindol (L2407), Prazosin (P7791), Prazosin (P7791)
Sinyal transdüksiyon mekanizmaları	Gi (cAMP değişimi) Gq/11 (IP3/DAG artışı)	Gi (cAMP değişimi) cGMP değişimi	Gq/11 (IP3/DAG artışı)
Radyoligandlar	2-[125I]-İyodomelatonin [3H]-Melatonin	2-[125I]-İyodomelatonin [3H]-Melatonin	2-[125I]-İyodomelatonin 2-[125I]-MCA-NAT
Doku ekspresyonları	Supraşiasmatik nükleus, retina, serebellum, arterler, pars tuberalis	Supraşiasmatik çekirdek, retina, serebellum, arterler	beyin, böbrek, testis

Melatonin ve Kardiovasküler Sistem

Uyku/uyanıklık döngüsünü ayarlayan bir biyolojik saat olan melatonin pineal bezde sentezlenir ve ritmik olarak geceleri dolaşım sistemine salınır (Jones ve ark., 2012). Uykusuzluğun koroner kalp hastalığı ve hipertansiyonla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Artmış sempatik sinir sistemi aktivitesinin bu hastalıkların patofizyolojisinde etken olduğu düşünülmektedir. (Hoshide ve Kario, 2010). Yaşla birlikte melatonin konsantrasyonu serumda azaldığı gibi, ürede de metaboliti olan 6-sülfatoksimeatonin miktarı da azalır. Yaşlanma sırasında akut veya kronik kalp damar hastalıklarının sıklığında artış gözlenmektedir. Son on yılda elde edilen veriler melatoninin kardiovasküler sistemi etkilediğini göstermektedir. Vasküler sistemde yer alan melatonerjik reseptörler ve bağlanma bölgelerinin varlığı, melatoninin reseptörlerinin fonksiyonel olarak melatoninin vazokonstrüktör veya vazodilatör etkileriyle bağlantılı olduğunu göstermektedir.



Şekil 8: Uyku Bozukluğu ve Hipertansiyon Arasındaki İlişki (Hoshide ve Kario, 2010)

Sıçan damar sisteminde melatoninin bağlanma bölgeleri radyoaktif 2-iyodomelatonin ile belirlenmiş ve sadece kaudal arter ve Willis çemberinde yer aldığı, bağlanmanın stabil, saturabil ve reversibel olduğu görülmüştür. Kaudal arterde NE ile kontraksiyon melatoninin ile konsantrasyona bağlı şekilde artmıştır. Düz kas kasılmasının ilk basamakları (inositol fosfolipit hidrolizi) ne de düz kas gevşemesi (adenilat siklaz aktivasyonu) melatonininden etkilenmemiştir. Bu çalışmada melatoninin termoregülasyonda yer alabileceği düşünülmüştür (Wiswanathan ve ark., 1990). Daha sonra yapılan bir çalışmada RT-PCR ve immunohistokimyasal kullanılan yapılan deneylerde sıçan aortasında MT1 reseptörünün mRNA ve protein düzeyinde varlığı tespit edilmiştir (Schepelmann ve ark., 2011).

Melatoninin sentetik türevi ramelteon, yaşlı, orta yaşlı ve genç sıçanlarda metabolik sendromun iki önemli özelliği olan hipertansiyona ve vücut ağırlığına etkisi bakımından değerlendirilmiştir. Spontan hipertansif (SHR) ve normotensif Wistar-Kyoto erkek fareler kullanılmıştır. SHR sıçanlarda (8-10 haftalık) akut değil ama kronik ramelteon (8 mg/kg/gün, 4 -12 hafta) uygulaması yaşa bağlı sistolik damar basıncını (*tail cuff method*) %45, vücut ağırlığını %30 azaltmıştır. Akut ve kronik ramelteon normotensif ratlarda vücut ağırlığını ve tansiyonu değiştirmemiştir (Oxenkrug ve Summergrad, 2010).

Bir çalışmada sağlıklı insanlarda çeşitli kan damarlarında oral verilen melatoninin kan akımı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Renal (*Doppler ultrasound*), ön kol (*venous occlusion plethysmography*), serebral kan akımı (*transcranial Doppler*), arterial kan basıncı ve kalp hızı, 10 sağlıklı gönüllüde (29 ± 1 yaş; 5 erkek ve 5 kadın) yatar pozisyonda 3 dakika boyunca ölçülmüştür. Ölçümler, (3 mg) melatonin veya plasebo (ağız yoluyla, emme) verildikten 45 dakika sonra uygulanmıştır. Aynı ölçümler melatonin ve plasebo verildikten 2 gün sonra tekrar uygulanmıştır. Melatonin kalp hızını ve ortalama kan basıncını değiştirmemiştir. Renal kan akım hızı (RKAH) ve renal vasküler kondüktans (RVK) melatonin verilen grupta plaseboya daha düşük bulunmuştur (sırasıyla; RKAH, 40.5 ± 2.9 ile 45.4 ± 1.5 cm/s; ve RVK, 0.47 ± 0.02 ile 0.54 ± 0.01 cm·s⁻¹·mmHg⁻¹). Tam tersi ön kol kan akımı ve ön kol vasküler kondüktans melatonin uygulamasından sonra plaseboya göre daha fazla bulunmuştur (FBF, 2.4 ± 0.2 vs. 1.9 ± 0.1 ml·100 ml⁻¹·min⁻¹; and FVC, 0.029 ± 0.003 vs. 0.023 ± 0.002 U). Melatonin serebral kan akımını plaseboya göre değiştirmemiştir. Ayrıca 5 mg bolus fentolamin melatonin ile azalan renal kan akımı geri çevrilmiştir. Bu yüzden melatoninin renal vazokonstriksiyona neden olan sempatik etkiyi artırmakta olduğu yorumu yapılmıştır (Cook ve ark., 2010).

Melatoninin tek başına sıçan kaudal arterinde vazoaaktif etkili olmadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Evans ve ark., 1992; Krause ve ark., 1995; Viswanathan ve ark., 1990; Monroe ve Watts, 1998). Ancak kaudal artere maksimum kasılmanın %10'u kadar kasılma yanıtına yol açan Phe verildikten sonra artan konsantrasyonda melatonin uygulanmış 10⁻¹⁰'dan 10⁻⁷'ye kadar kasılma yanıtını artmış fakat 10⁻⁷'den 10⁻⁵'e kadar azalma görülmüştür. 4P-ADOT inkübasyonundan sonra ise 10⁻¹⁰ ile 10⁻⁸ M arası kasılma yanıtı değişmemiş, 10⁻⁸'den 10⁻⁵ M'a kadar artma gözlenmiştir. Özet olarak 10⁻⁷ M ila 10⁻⁵ M melatonin kasılmayı artırmış, MT₂ antagonisti varlığında ise azalma gözlenmiştir (Bu çalışmada endotel önceden çıkarılmıştır). Dolayısıyla melatoninin sıçan kaudal arterinde düz kasta MT₂ reseptörü aracılığıyla adrenerjik kasılmayı azalttığı sonucuna ulaşılmıştır (Doolen ve ark., 1998). Aynı araştırma grubu tarafından melatoninin kaudal arterde çift ve birbirine ters etkisinin olduğu; melatoninin MT₁ reseptörünün aktivasyonu ile vazokonstriksiyona, MT₂ reseptörü aracılığıyla vazodilatasyona neden olduğu gözlenmiştir (Masana ve ark., 2002).

Melatoninin sıçan kuyruk arterinde meydana getirdiği kasılma mekanizması incelendiğinde, artan konsantrasyonlarda melatoninin tek başına gözlenebilir kasılma yanıtlarına neden olmadığı görülmüştür. Yalnız vazopressinle preaktivasyon sonrası verilen melatonin, maksimum kasılma yanıtının %50'sini oluşturacak şekilde vazokontraksiyon oluşturmuştur. Melatonin ile oluşan kasılma cevapları gözlenirken meydana gelen dalgalanmalar nifedipin (0.3µM) ilavesiyle kaybolmuş ve kasılma yanıtları düşmüştür. Potasyum kanal blokeri karibdotoksin ilavesiyle melatonin ile gözlenen maksimum kasılma yanıtı değişmemiş fakat

dalgalanmaların büyüklüğü artmıştır. cAMP'yi uyararak adenilat siklazı aktive eden forskolin (0.6µM) ile ön inkübasyondan sonra kontrole göre melatonin ile oluşan kasılma yanıtlarının arttığı görülmüştür. Forskolin ve nitroprussid ile ön uygulama yapıldığında, melatonin ile cevap elde etmek için kullanılan AVP konsantrasyonu 10 kat artırılmıştır. Melatonin reseptör agonistlerinin etkinlik sırası büyükten küçüğe 2-iyodomelatonin, melatonin, S20098, GR196429 şeklinde sıralanmıştır. MT2 selektif antagonisti olan luzindol ile melatoninin etkisi antagonize edilmiştir (Lew ve Flanders, 1999).

Melatoninin tek başına sıçan aortasında vazoaktif etkili olmadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Monroe ve Watts, 1998). Fakat melatoninin 30mM KCl ile ön kasılma sağlanan aortada konsantrasyon bağımlı bir şekilde gevşemeye neden olduğu ve bu yanıtlar endotel tabakanın varlığından etkilenmemekte olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada melatonin (10 nm) metoksamin ve klonidin ile oluşan kasılmanın potansiyelini değil ama efikasisini düşürdüğü fakat isopreterenol ile oluşan β adrenerjik cevabı değiştirmedığı görülmüştür. Vasküler halkaların lityum sülfat (0.1mM) ile muamelesi ile melatonin ile oluşan gevşemenin tamamen bloke olduğu, bu yüzden inositol fosfat yolağı gevşemede rol oynayabileceği düşünülmüştür. Bundan başka bir protein kinaz C aktivatörü olan forbol 12-miristat 13-asetat ile damar halkaları muamele edildiğinde, melatonin ile gevşeme antagonize olmaktadır. Melatonin farmakolojik konsantrasyonlarda (10^{-4} M) vasküler düz kas hücrelerinin kalsiyuma cevabını bozmuştur (Weekley, 1991). Bu çalışmada, melatonin reseptör antagonistleri kullanılmamış, dolayısıyla reseptör aracılığıyla gerçekleştirilen etki değerlendirilememiştir.

Melatonin 10^{-10} ila 10^{-11} M gibi fizyolojik konsantrasyonlarda KCl ile oluşturulan kasılma yanıtında bir değişim ortaya koymadığını fakat 10^{-5} ila 10^{-3} M konsantrasyonda KCl ilavesinden 10 dakika önce eklendiğinde KCl ile elde edilen kasılmada azalmaya neden olduğu, 2×10^{-6} M luzindolün azalan KCl kasılmasında bir değişikliğe neden olmadığı sonucu elde edilmiştir Aynı çalışmada fenilefrin ile yarı maksimal ön kasılma sağlanan sıçan aortasında melatonin (10^{-5} M) asetilkolin (10^{-9} - 10^{-4} M) ile elde edilen gevşemeyi değiştirmemiştir (Monroe ve Watts, 1998). Ancak bu çalışmanın sonuçları incelenirse melatonin ve N-asetilserotonin için kullanılan çözücünün de gevşemeyi artırdığı görülmektedir.

Melatoninin tavşan aortasında, iliak ve renal arterde 5-HT, NE ve (Anjiotensin 1) AT-1 ile oluşturulan kasılma yanıtlarına etkisinin araştırıldığı çalışmada, 10^{-4} ve 10^{-3} M, 5-HT'nin aorta, iliak ve renal arterlerde oluşturduğu kasılma yanıtlarını düşürmüştür fakat 10^{-3} M melatonin NE ve AT-1 ile oluşan kasılmaya etki etmemiştir. Her üç preparatta da, 10^{-3} M melatonin KCl kasılmasında hafif bir inhibisyon yapmıştır. EGTA (0.01mM) içeren kalsiyumsuz medyumda, 5-HT (10^{-5} , 10^{-4} M) ile oluşan cevap melatonin (10^{-4} , 10^{-3}) ile inhibe olmuştur. EGTA (0.01mM), nifedipin (10^{-6} M), 5-HT (5×10^{-7} M) içeren medyuma Ca^{2+} (2mM) ilave edildiğinde tonik kasılma gözlenmiştir. Bu kalsiyum bağımlı, nifedipine duyarsız kasılma melatonin ile azalmıştır. Sonuç olarak melatonin, NE ve AT1 ile oluşan kontraksiyonu değil 5-HT ile oluşan kontraksiyonu inhibe etmiş bunu da daha çok hücre içi depolardan Ca^{2+} salınımına değil hücre dışından Ca^{2+} girişine etki ederek yapmıştır (Satake ve ark.,1986).

Bu tez çalışmasında melatoninin KCl ve phe ile kasılma yanıtı üzerindeki etkisi araştırılırken, luzindol tek başına ve melatonin ile kombine edilerek oluşturduğu etki bakımından değerlendirme yapılmıştır. Aynı şekilde Ach ve SNP ile gevşeme

yanıtları da luzindolün tek başına ve melatonin ile birlikte gösterdiği etki ile kıyaslanmıştır.

Sıçan *cremaster* kası mikrovasküler endotel hücrelerde MT2 reseptörleri tespit edilememiştir. Dinlenme durumundaki endotel hücrelerde yapısal endotelial NO sentaz, plazmalemmal kaveolede, inhibitör protein kaveolin ile bağlı şekilde bulunur, intraselüler kalsiyum artışı ile kaveolin/eNOS kompleksi ayrılır ve eNOS plazma membranına göç eder ve ikinci bir uyarıyla substratı L-arjinini, L-sitrüllin ve NO'e dönüştürür. Bazı damar yataklarında ise endotel bağımlı gevşeme pul pul yırtılma stresi (*laminar shear stress*) veya Ca^{2+} mobilizasyonu yoluyla G-protein bağlı reseptörler aracılığıyla NO üretimi sonucu olmaktadır. eNOS'un vasküler permeabilitede de rol oynadığı görülmüştür. Sıçan *cremaster* kası mikrovasküler endotel hücrelerde AANAT ve HiOMT ekspresyonuna da rastlanmamıştır. Melatonin, L-NAME'e duyarlı damarlarda bradikinin, histamin, karbakol, 2-metiltiy ATP (metabotropik P2Y reseptörlerini aktive eden agonist) ile uyarılan NO üretimini inhibe etmiş fakat ATP ve α, β -metilen ATP (ligand-kapılı iyon kanalı P2X receptorlerini aktive eden agonist) ile uyarılan NO üretimini inhibe etmemiştir. Bu inhibisyonlardan hiçbiri luzindol ile önlenememiştir. Melatonin, bradikinin (%40) ve 2-metiltiy ATP (%62) ile oluşturulan intraselüler Ca^{2+} mobilizasyonunu azaltmış fakat ATP ile oluşturulan Ca^{2+} mobilizasyonunu değiştirmemiştir. Sonuç olarak sıçan *cremaster* kasından izole edilen endotel hücrelerinde melatonin *in vitro* etkisini intraselüler depolardan Ca^{2+} mobilizasyonunun inhibisyonu ile göstermekte ve metabotropik reseptörler bu etkiye aracılık etmektedir sonucuna varılabilir. Melatoninin metabotropik P2Y reseptör agonisti 2-metiltiy ATP ile oluşan NO sentezini bloke etmesi, hücre içi depolardan Ca^{2+} mobilizasyonunun inhibisyonuyla bağlantılı olduğu görülmektedir (Silva ve ark., 2007).

Başka bir çalışmada ise melatoninin domuz koroner arterinde NO aracılı gevşemeyi baskılayıcı etkisinin MT2 reseptörleri aracılığıyla olduğu ortaya konmaktadır (Tunstall ve ark., 2010)

Melatoninin vasküler permeabilite üzerine etkisi proinflamatuvar ajanlar ve melatoninin birlikte sıçan dorsal derisine enjekte edildikten sonra Evans blue boyasıyla kanın fişkırması ölçülerek değerlendirilmiştir. Karragen (bir nonspesifik proinflamatuvar ajan), histamin, serotonin ve bradikinin (endotel hücreler üzerine etkili ajanlar), lökotrien B4 ve N-formil-metionil-lösil-fenilalanin (FMLP) (nötrofil toplanmasını artıran droglar) arasından melatonin yalnızca lökotren B4 ile artan vasküler geçirgenliği azaltmıştır (Lotufo ve ark., 2006).

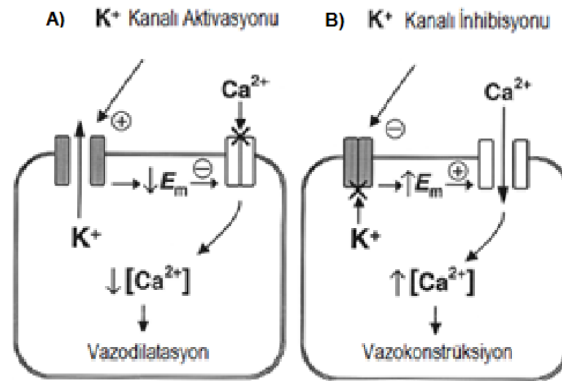
In vitro şartlarda bradikinin ile uyarılan NO üretimi üzerine melatoninin etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada sıçan *cremaster* kasından izole edilen mikrovasküler endotel hücreleri kullanılmıştır. Mikrovasküler hücreler NO veya Ca^{2+} u tespit etmek için kullanılan floresan boyalarla inkübe edilmiştir. Bradikinin(1-100nm) tek başına beklenen şekilde hem sitosolik Ca^{2+} hem de NO miktarını artırmıştır. Melatonin ise 1nm konsantrasyonda bradikinin ile indüklenen NO üretimini azalttığı fakat Ca^{2+} artışını değiştirmedeği görülmüştür. Bu çalışmada nonselektif MT reseptör antagonisti luzindolün veya MT2 selektif antagonist 4P-PDOT'un melatonin bu etkisini geri çevirmediği görülmüştür. Aynı çalışmada MT3 reseptör agonisti 5-MCA-NAT (1nm) in ise hiç etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu çalışmada melatonin etkisi NO'in alt yolaklarında ortaya çıkabilecek bozulmaya bağlanmıştır çünkü melatoninin 1 μ M bradikinin ile artan

cGMP üretimini azalttığı görülmüştür. Bu çalışmada melatoninin bradikinin ile aktive olan NO üretimini azaltması; Ca^{2+} -calmodulin çifti ile NOS etkileşiminin bozulmasından dolayı olabileceği belirtilmektedir (Tamura, 2006).

Vasküler Sistemde Rol Oynayan Ajanlar

Potasyum Klorür: Potasyum iyon kanalı aktivitesi, vasküler kas hücrelerinin membran potansiyelleri (E_m) ve dolayısıyla vasküler tonusun belirlenmesinde önemli bir düzenleyicidir.

Vasküler düz kas hücre membranında bulunan bir potasyum kanalı açıldığında, K^+ eflusu artar ve membran potansiyelinin hiperpolarize olmasına, voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarının kapanmasına, hücre içine Ca^{2+} girişinin azalmasına ve vazodilatasyona sebep olur. Tam tersi K^+ kanalı kapandığında ise E_m depolarize olur, voltaj bağımlı Ca^{2+} kanalları açılır, sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonu artar ve vazokonstrüksiyona neden olur (Sobey 2001).



Şekil 9. K⁺ Kanalı Aktive Olduğunda (A), K⁺ Kanalı İnhibe Olduğunda (B), Vasküler Düz Kasda Meydana Gelen Değişiklikler.

A: hücre zarındaki K^+ kanalı aktive olduğunda (açıldığında), E_m 'in azalmasına (hiperpolarizasyona) neden olan K^+ kanalı, K^+ 'un hücre dışına çıkmasına izin verir ve sonra voltaj bağımlı Ca^{2+} kanalları inhibe olur (kapanır) ve sitozolik Ca^{2+} seviyesi azalır ve vasküler kasın gevşemesiyle sonuçlanır. B: tam tersi bir olay gerçekleşir, vasküler kasdaki K^+ kanalı inhibisyonu ve E_m artmasına (depolarizasyona) neden olur. artan E_m 'ye cevap olarak voltaj bağımlı Ca^{2+} kanalları açılır, Ca^{2+} hücre içine girer ve sitozolik Ca^{2+} seviyesi artar ve vasküler kontraksiyona neden olur (Sobey, 2001).

Dört ana tip vasküler K^+ kanalı bulunmaktadır (Sobey, 2001).

Artan hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ile aktive olan K^+ kanalları (BK_{Ca}) özellikle damar düz kas hücrelerinde yoğunlaşmıştır ve hücre içi Ca^{2+} ile ve E_m depolarizasyonu ile aktive olur. Bazı vazokonstriktör ajanların etkisiyle veya artan damar içi basınç dolayısıyla yükselen damar depolarizasyonuna ve kasılmaya karşı duran önemli bir tamponlama mekanizması olarak etki eder. Hücre içi cAMP veya cGMP seviyelerini artıran vazodilatörler BK_{Ca} kanallarını aktive edebilir (Sobey, 2001).

Voltaj bağımlı K^+ kanalları (K_v) damar düz kas hücrelerinde E_m yaklaşık -35 ila -55 mV olduğu zaman aktive olur, depolarizasyon ve vazokonstrüksiyona karşı önemli bir tamponlama mekanizması olarak hizmet eder. cAMP veya NO /cGMP,

K_v kanallarını aktive edebilir ve bu kanallar proteinkinaz C ile inhibe olabilir (Sobey, 2001).

ATP duyarlı K^+ kanalları hücre içi ATP ile inhibe olur ve normal koşullarda çoğu damar düz kas hücrelerinde genellikle kapalıdır (Sobey, 2001).

İçeri yönlü düzeltici K^+ kanalları (K_{IR}) damar miyositlerinin E_m 'leri elektrofizyolojik tekniklerle değiştirilirse, bir tip K^+ kanalı içeri yönlü K^+ akımına neden olarak düzeltici rol oynar. Hücre içi poliamidlerin ve magnezyum iyonlarının engelleyici etkisi nedeniyle bu içeri yönlü düzeltici K^+ kanalları, K^+ iyonlarını dışarı ilettiğinden daha fazla oranda içeri doğru iletir. K^+ konsantrasyonu normal ekstraselüler K^+ konsantrasyonu olan 3 ila 5 mmol/L'nin biraz üstüne çıkarsa dinlenme durumundaki dışarı doğru K^+ akımı, K_{IR} kanalları aracılığıyla artar. Gerçekten nöron veya kas aktivasyonu sırasında olduğu gibi hücre dışı K^+ hafifçe artarsa (Örneğin <10mm/L) paradoksik olarak K_{IR} kanalları tarafından K^+ efluksuna bağlı olarak vasküler hiperpolarizasyon ve vazorelaksasyon oluşur (Sobey, 2001).

Endotele dayalı hiperpolarizasyon: Vasküler düz kasın iç yüzünü kaplayan endotel'in stimülasyonuna bağlı olarak başlatılan bir sinyal olarak bilinen 'endotel bağımlı gevşeme', endotelden kaynaklanan en az bir gevşetici faktörün salınmasını içerir. Birçok önemli *Endothelial-Derived Relaxing Factor* (EDRF) bulunmaktadır bunlardan iki tane en çok bilineni NO ve prostasiklidir. NO ve prostasiklinin oluşturduğu vasküler gevşemenin bir bölümü K^+ kanallarının aktivasyonu ile olmaktadır (Sobey 2001).

Fenilefrin bir selektif α_1 adrenerjik reseptör agonistidir, sadece yüksek konsantrasyonlarda β reseptörleri de aktive eder. Bu drog intravenöz infüzyon boyunca belirgin arterial vazokonstriksiyona neden olur (Brunton ve ark., 2006).

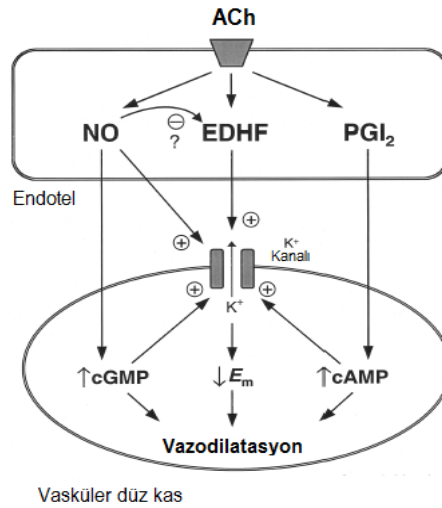
Presinaptik olarak lokalize olmuş α_2 ve β_2 reseptörleri sempatik uçlarından nörotransmitter salımını düzenlemede önemli rol oynarken, tam tersi α_1 ve β_1 reseptörler temel olarak periferik hedef organlardaki sempatik adrenerjik sinir bitimlerinin hemen civarında lokalize olmuştur. Aortada bulunan ve vazokonstriksiyona neden olan predominant reseptör α_{1D} olduğu kaydedilmiştir (Brunton ve ark., 2006).

α_1 reseptörler uyarıldıktan sonra sinyal iletimi öncelikli olarak G_q -PLC β -IP $_3$ -Ca $^{2+}$ yolunu takip eder. Burdan CaM kinazlar gibi diğer kalsiyum ve kalmodulin duyarlı yollar aktive olur. Bir çok düz kasta olduğu gibi hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artması, kalmodulin bağımlı miyozin hafif zincir kinaz gibi kalsiyum duyarlı protein kinazları aktive eder ve kasılma gelişir, gastrointestinal düz kasta ise α_1 reseptörünün uyarılmasına bağlı artan hücre içi kalsiyum konsantrasyonu, kalsiyum bağımlı potasyum kanallarını aktive ederek gevşemeye neden olur (Brunton ve ark., 2006).

Asetilkolin Reseptöre bağlı olarak muskarinik ve nikotinik etki göstermektedir. Asetilkolin bir nörotransmitter olarak farklı organlarda farklı etkiler göstermektedir. Damarlarda muskarinik reseptörler bulunduğu halde kolinerjik innervasyon bulunmamaktadır. Asetilkolin arteriollerde vazodilatasyona neden olur. Bu etkiye önceleri EDRF isimli bir maddenin neden olduğu düşünülse de daha sonra bu maddenin NO olduğu anlaşılmıştır.

Bradikinin, anjiotensin II, serotonin ve asetilkolin gibi G protein bağımlı reseptör agonistleri aracılığıyla reseptörün uyarılması endotel hücrelerinde intraselüler

kalsiyum konsantrasyonunu artıran bir sinyal iletim mekanizmasıdır. Asetilkolin endotel hücrelerinin plazma membranında yer alan muskarinik (M3) reseptörlerine bağlanarak, fosfoinosit fosfolipaz C- β 'yi aktive eder. Bu da daha sonra fosfotidilinositol-4,5-bifosfatı hidroliz eder ve inositol 1,4,5-trifosfat ve diaçilgliserole dönüştürür. Burdan çıkan IP_3 , IP_3 reseptörlerine (IP_3R) bağlanarak endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınmasına ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artmasına neden olur. Endoplazmik retikulumun kalsiyum içeriğinin yeniden tamamlanması endotel hücrelerinde sarkoplamik/endoplazmik retikulum Ca^{2+} ATPaz (SERCA)'ya bağlıdır. Endoplazmik retikulumda bulunan kalsiyum endotel hücrelerinde bulunan toplam kalsiyumun %75'idir kalan %25 intraselüler kalsiyum ise mitokondride depo edilmektedir. Endoplazmik retikulumdan sonra mitokondriden de kalsiyum sinyalini güçlendirmek amacıyla kalsiyum salınabilir, bu kalsiyum aynı zamanda endoplazmik retikulumdaki kalsiyum depolarının yeniden dolmasına da yardımcı olur (Socha 2011). Asetilkolinin intikal ettirdiği hiperpolarizasyon orta ve küçük ve kalsiyumla aktive olan potasyum kanalları sayesinde endotel boyunca oluşur ve miyoendotelial *gap junction channels* (GJC) aracılığıyla düz kas hücrelerine iletilir. Sitoplazmik kalsiyum, potent bir vazodilatör olan NO üretimini artırır (Socha ve ark., 2011).



Şekil 10. Endotel Hücrelerde Asetilkolin (ACh) ile Oluşan Vazorelaksan Cevap Yolağı (Sobey, 2001)

Sodyum nitroprussid (SNP): 1950'lerden beri bilinen fakat insanlarda hipotansif etki gösterdiği 1929'da keşfedilen güvenilir, kısa etkili, hipertansiyonu kontrol etmek için kullanılan bir ajandır. Sodyum kısmı vücuda alındıktan sonra ayrılır ve nitroprussid nitrik oksit salarak etki eder. NO, guanilil siklaz- cGMP-PKG yolağını aktive eder ve vazodilatasyona yol açar. Vasküler endotel hücrelerin doğal olarak ürettiği NO'nin aktivitesini taklit eder. NO guanilil siklazı aktive eder ve hücre içinde cGMP seviyesini artırır, cGMP PKG'yi (*cyclic GMP-dependent protein kinase*) aktive eder ve PKG siklik nükleotid fosfodiesterazların aktiviteleri düzenler. Düz kaslarda gözlenen net sonuç miyozin hafif zincirinin fosforilasyonunda düşme, sitozolde bulunan kalsiyum konsantrasyonunda azalma ve gevşemidir. Artan hücre içi cGMP'nin aktive ettiği PKG düz kasta bulunan birçok proteinin fosforilasyonunu katalize eder. Ayrıca PKG kendisine

bağlandığında, miyozin hafif zincir fosfataz etkin hale geçer ve miyozin hafif zincirinin defosforilasyonu ile vazorelaksasyon gözlenir (Brunton ve ark., 2006).

Nitrik oksit: Endotel hücre fonksiyonu vasküler tonus ve permeabiliteyi düzenleme bakımından önemli bir role sahiptir. Bradikinin ile nitrik oksit sentazın uyarılarak endotelial nitrik oksit salımının artırılması yoluyla sağlanan vasküler gevşeme en iyi bilinen fizyolojik yollardan biridir.

Nitrik oksit biyolojik sistemlerde nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir. Nitrik oksit sentaz oldukça kompleks bir enzimdir ve moleküler oksijen, arjinin ve NADPH üzerine etki ederek NO, sitrüllin ve NADP⁺ oluşturur. Bu işlem ilave beş kofaktör (FMN, FAD, Hem, kalmodulin, tetrahidrobiopterin) ve iki tane divalent katyon (kalsiyum ve hem demiri) gerektirir. Üç farklı NOS izoformu karakterize edilmiştir. Bunlar nöronal NOS, endotelial NOS, indüklenebilir NOS olarak adlandırılmaktadır. NO nöronlarda, endotelial hücrelerde, plateletlerde ve nötrofillerde homeostatik uyarılara verilen bir yanıt olarak oluşur (Moncada, 1992; Nathan, 1992). NO çabukça ($t_{1/2}=4$ sn) temizlenir ve parakrin olarak hücre sel sinyale dönüşür. NO, guanilat siklazın hem prostetik grubuyla etkileşerek enzimi aktive eder ve cGMP seviyesini artırır. NO makrofaj, fibroblast, hepatositler gibi diğer hücrelerde de mikromolar konsantrasyonlarda inflamatuvar ve mitojenik uyarılara cevap olarak üretilir. Bu durumda biyolojik rolü dışardan gelen patojenlere karşı oksidatif toksisite göstererek savunma sağlamaktır. Bu çok yüksek NO seviyesi peroksinitrit oluşumuna, demir-sülfür kümelerinin tahribine, tiyol gruplarının nitrozasyonuna ve proteinlerin tirozin residülerinin nitrasyonuna neden olur. Bu sebeple farklı biyolojik sistemlerde üretilen NO miktarı da farklıdır ve sonuçta ortaya çıkacak olan kimyasal reaksiyonda farklı olmaktadır (Nathan, 1992).

GEREÇLER

Vasküler Fonksiyon Deneylerinde Model Olarak Kullanılan Sıçan Aortası

Erkek Wistar sıçanlar Anadolu Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden etik kurul onayı alınarak temin edilmiştir. Aynı yaşta 250-300 g ağırlığında erkek albino Wistar sıçanlar 12 saat karanlık 12 saat aydınlık döngüsünde (ışıklar 8.00-20.00 arasında açık kalmaktadır), 24±1°C sıcaklıkta, havalandırılmalı odalarda bulundurulmuş ve yem ve su kısıtlaması olmaksızın beslenmiştir.

Endotel Deneylerinde Model Olarak Kullanılan HUVEC Hücre Dizisi

Hücre kültürü deneylerinde ise HUVEC-C (ATCC) hücreleri kullanılmıştır. Hücreler %5 karbondioksit inkübatöründe 37°C sıcaklıkta çoğaltılmıştır.

HUVEC ve Aorta Deneylerinde Ortak Kullanılan Kimyasallar

Melatonin (Merck)

Luzindol (Santa Cruz)

Aorta Deneylerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

SNP (Sigma)

DMSO (Merck)

Distile su (Bibam)

Fenilefrin (Sigma)

Asetilkolin (Sigma)

Eldiven

NaCl (Sigma)

KCl (Sigma)

CaCl₂ (Sigma)

MgSO₄ (Sigma)

KH₂PO₄ (Sigma)

NaHCO₃ (Sigma)

D-Glucoz (Sigma)

Aorta Deneylerinde Kullanılan Malzemeler

CO₂/O₂ tüpü

Magnet

Petri kabı

Pens

Mikrocerrahi makası

Künt büyük makas

Çeşitli hacimdeki otomatik mikropipetler (10, 20, 200, 1000µl) (Nichipet EX)

Apendorf tüpler

Pipet uçları

Aorta Deneylerinde Kullanılan Cihazlar

İkili organ banyosu sistemi

Organ banyosu *Data Acquisition System* yüklü dizüstü bilgisayar (Dell)

Hassas terazi

Vorteks

Manyetik karıştırıcı

HUVEC Deneylerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

DMSO (Merck)

FBS (Sigma)

MTT (Sigma)

PBS (Sigma)

EGF *supplement* (Sigma 0760)

Penisilin-streptomisin Solüsyonu (Gibco)

Nutrient Mixture F-12 Ham medyumunu (Sigma N6760-10x1L)

Steril distile su (BİBAM)

%9,2 NaHCO₃ çözeltisi (çözücü su)

1 N HCl çözeltisi

Total Nitrit/Nitrat Ölçüm Kiti (Cayman)

Kalsiyum Ölçüm Kiti (BioVision)

HUVEC Deneylerinde Kullanılan Malzemeler

Otoklavlanabilir cam şişe (İsolab)

5 ve 10 ml'lik cam pipet (İsolab)

1, 10, 100 ve 1000 µl'lik pipet ucu (Eppendorf)

1, 10, 100 ve 1000 µl'lik otomatik pipetör (Nichipet EX)

Neubauer lamı (İsolab)

pH indikatör kağıdı (Merck)

Lamel (İsolab)

25 ve 75 cm²'lik kültür flakaları (doku kültürü uygulanmış) (Thermo Scientific)

96 kuyucuklu plakalar (Costar 3599)

Çok kanallı 100 ml'lik pipetör (Eppendorf)

5 ve 10 ml'lik enjektör (Ayset)

45 µm steril filtre (Gema Medical S.L.)

Parafilm

HUVEC Deneylerinde Kullanılan Cihazlar

Steril karbondioksit inkübatörü (Heraeus D6450))

Otoklav (Eryiğit Tıbbi Cihazlar)

Kuru hava Sterilazatörü (Heraeus C6420)

Inverted mikroskop (Olympus CKX41)

ELISA okuyucu (ELx 808 ı Ultra microplate reader)

Laminar Flow Kabin (Holten LaminAir)

Su banyosu (Nüve BM 402)

Soğutmalı santrifüj (Heraeus Megafuge)

Hassas Terazi (And)

YÖNTEMLER

Bu tez çalışmasında iki grup deney yapılmıştır, bunlar aorta deneyleri ve hücre kültürü deneyleri olarak ayrılmıştır. Aorta deneyleri melatonin ve luzindol kullanılarak sıçan torakal aortasında yapılan fonksiyonel *in vitro* damar yanıtı çalışmalarını ve HUVEC kullanılarak yapılan MTT, total nitrit ve nitrat miktarı ile kalsiyum miktar tayini çalışmalarını içermektedir. Elde edilen verilere ait grafikler çizilirken Microsoft Excel[®] ve Graph Pad Prism[®] bilgisayar programları kullanılmıştır. Sonuçlar değerlendirilirken gruplar arası anlamlılığı değerlendirmek üzere istatistiksel analizler Graph Pad Prism[®] programı ile yapılmıştır.

Aorta Deneyleri

Kimyasal Maddelerin Hazırlanması

Deney sırasında kullanılan kimyasal maddeler, %2 etil alkol içeren su içinde çözülerek konsantrasyonu 10^{-2} M olan stok çözeltileri biçiminde hazırlanıp. Alikuatlarına ayrılarak deneyler için kullanılana kadar -20°C dondurucuda saklandı. Kullanılacağı zaman çözülüp, 1:9 oranda su ile dilüe edilerek konsantrasyonları onda bir oranında azalan seri çözeltileri hazırlandı. Elde bulnan çözelti konsantrasyonu, banyo içindeki 10ml krebs çözeltisine ilave edildiğinde oluşacak banyo konsantrasyonu hesaplanarak organ banyosuna eklendi.

Çizelge 2. Standart Krebs Çözeltisi (Barron ve ark., 2002)

MADDE	MİKTAR (mM)
NaCl	118
KCl	4.7
NaH_2PO_4	1.2
NaHCO_3	25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.2
Glukoz	11.2
CaCl_2	2.5

Sıçan Torakal Aortasının İzolasyonu

Servikal dislokasyon yöntemiyle öldürülen sağlıklı erkek sıçanların göğüs kafesleri açılarak kalpleri çıkarıldı ve torasik aortaları endotellerine hasar vermeden izole edildi. İzole aortalar, oksijenlendirilmiş standart krebs çözeltisi'nin bulunduğu petri içine alındı, yağ ve bağ dokularından arındırılarak, 4mm'lik halkalar halinde kesildi. Her deneyde aynı segmentler kullanılmasına dikkat edildi. İzometrik transdüserin ayarları her deneyden önce, bir ucuna 2 g'lık ağırlık asılarak kontrol edildi. Aorta kesitleri bir ucu transdüserine bağlı kancaya diğer ucu doku tutucu kancaya tespit edilecek biçimde kancalar aorta kesitlerinin içinden geçirilerek, içinde standart krebs çözeltisi bulunan, organ banyosu içine kondu. Deney süresince organ banyosunun sıcaklığının 37°C olması sağlandı ve çözelti %95 O_2 - %5 CO_2 içeren gaz karışımı ile havalandırıldı. Preparat, izole organ banyosu ortamına uyum sağlaması için, 2 g'lık ağırlığın oluşturduğu gerilim düzeyine kadar kastırıldı ve 1 saat boyunca, her 15 dakikada bir ortam sıvısı yenilenerek Krebs çözeltisi içinde inkübasyonda bırakıldı. Deneysel işlemler bir saatin sonunda başlatıldı.

Deney Grupları ve İnkübasyon İşlemleri

Aorta yanıtları için kullanılmak üzere sağlıklı erkek albino Wistar sıçanlar kullanılmıştır. Yem ya da su kısıtlaması yapılmaksızın, deney hayvanlarına Anadolu Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi personeli tarafından bakılmıştır.

İzometrik transdüser bağlı organ banyosu sistemine asına aorta halka kesitlerine aşağıda yer alan maddeler uygulanmıştır.

1. Kontrol grubu: Sağlıklı erkek sıçan torasik aortasına hiçbir madde uygulanmamıştır.
2. MLT grubu: Yalnız melatonin (10^{-5} M) organ banyosuna eklenerek 5 dakika inkübasyon süresince bekletilmiş ve deney boyunca ortamda bulunmuştur.
3. MLT+LZL grubu: luzindol (10^{-5} M) organ banyosuna eklendikten sonra 20 dakika inkübe edilmiş ve son 5 dakikada Melatonin (10^{-5} M) ilave edilerek 5 dakika sonunda deneylere başlanmıştır.
4. LZL grubu: Yalnız luzindol (10^{-5} M) organ banyosuna eklenerek 20 dakika inkübasyon süresince bekletilmiş ve deney boyunca ortamda bulunmuştur.

Vasküler Fonksiyon Testleri

Aorta Dokularının Standardizasyonu ve 40mM KCl ile Konsantrasyon Cevap Deneyleri

Bir saatlik inkübasyon periyodunun ardından, tek konsantrasyon KCl (40mM) ile sabit bir kasılma yanıtı veren aortaların gerimi kaydedildi. Bu işlemin ardından dokunun bazal tonusunun sağlanabilmesi için, yarım saat süreyle dinlenmeye bırakıldı ve dokunun içinde bulunduğu standart krebs çözeltisi, her 15 dakikada bir değiştirildi.

Endotel Varlığının Tespiti

Endotel varlığının saptanabilmesi amacıyla, fenilefrin (phe) submaksimal konsantrasyonu (10^{-5} M) kullanılarak, ön kasılma sağlandı ve platoya erişilince, asetilkolin (Ach) 10^{-6} M konsantrasyonu ile gevşeme yanıtları ölçüldü. Deney sonunda doku, yarım saat süreyle, dinlenmeye bırakıldı ve dokunun içinde bulunduğu çözelti, her 10 dakikada bir değiştirildi. Deneylerde yalnız Ach ile %95 ve daha fazla gevşeme yanıtı oluşturan dokular kullanıldı.

Kümülatif Phe Konsantrasyon Cevap Deneyleri

Bu grup deneylerde, kontrol gurubunda aorta dokusunun, Phe yanıt verirliliğinin araştırılması amacıyla, Phe'in 3×10^{-9} - 10^{-5} M arası konsantrasyonları kullanılarak, kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrileri çıkarıldı. Elde edilen eğriden, maksimum kasılmanın %90'ünün gerçekleştiği konsantrasyon (EC_{90}) saptandı ve bu konsantrasyon, sonraki deneylerde, ön kasılma sağlamak amacıyla kullanıldı. Deney sonunda, yarım saatlik dinlenme periyodu boyunca, her 15 dakikada bir dokunun içinde bulunduğu çözelti değiştirilerek bazal tonus sağlandı.

Kümülatif Ach Konsantrasyon Cevap Deneyleri

Bu grup deneylerde, aorta dokusunun, Ach yanıt verirliliğinin araştırılması amacıyla, Phe ile %90 kasılma sağlandıktan sonra Ach'in 10^{-8} - 10^{-5} M arası konsantrasyonları kullanılarak, kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrileri çıkarıldı. Deney sonunda, yarım saatlik dinlenme periyodu boyunca, her 15 dakikada bir dokunun içinde bulunduğu çözelti değiştirildi, bazal tonus sağlandı. Bu deneyler ayrı bir grup endotelsiz aorta kullanılarak tekrarlandı.

Kümülatif SNP Konsantrasyon Cevap Deneyleri

Bu grup deneylerde, aorta dokusunun, SNP yanıt verirliliğinin araştırılması amacıyla, Phe ile %90 kasılma sağlandıktan sonra SNP'in 10^{-9} - 10^{-6} M arası

konsantrasyonları kullanılarak, kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrileri çıkarıldı. Deney sonunda, yarım saatlik dinlenme periyodu boyunca, her 15 dakikada bir dokunun içinde bulunduğu çözelti değiştirilerek, bazal tonus sağlandı. Bu deneyler ayrı bir grup endotelsiz aorta kullanarak tekrarlandı.

HUVEC Deneyleri

Hücrelerin Çoğaltılması

Hücre kültüründe kullanılan HUVEC hücreleri sayın Prof. Dr. Tansu Koparal'dan temin edilmiştir. Hücreler %5 karbondioksit ve %10 nem içeren hücre kültürüne uygun (Heraeus) inkübatör içinde 25 cm²'lik flasklarda çoğalmaya bırakıldı.

Deney Grupları

1. Kontrol HUVEC
2. MLT: Artan konsantrasyonda melatonin (10^{-10} - 10^{-7} mM) ile inkübe edilen HUVEC hücreleri
3. MLT ve LZL: Artan konsantrasyonda melatonin (10^{-10} - 10^{-7} m M) ve 10^{-5} M veya 10^{-6} M LZL ile inkübe edilen HUVEC hücreleri
4. MLT ve 4P-PDOT: Artan konsantrasyonda melatonin (10^{-10} - 10^{-7} m M) ve 10^{-5} M veya 10^{-6} M 4P-PDOT ile inkübe edilen HUVEC hücreleri
5. MLT ve GR135531: Artan konsantrasyonda melatonin (10^{-10} - 10^{-7} m M) ve 10^{-5} M veya 10^{-6} M GR135531 ile inkübe edilen HUVEC hücreleri

Hücre Sayımı

HUVEC'ler yeterli sayıya eriştikleri zaman üzerlerindeki medyum uzaklaştırıldı ve bir kez 2 ml tripsin ile yıkandıktan sonra 2 ml tripsin ile 1 dakika inkübatörde bekletildi ve flastan hücreler kaldırılarak, (0,92 g/l NaHCO₃, 30 mg/l EGF supplement (sigma 0760), %20 FBS içeren) ham's F12 medyum ile yıkanarak toplandı. Nuebauer lamına 10 µl hücre süspansiyonundan konularak *inverted* mikroskopta sayıldı. Bir 1mm³'de bulunan hücreler sayılıp, 1 ml'deki hacmi bulmak amacıyla 10^4 ile çarpıldı. Deney için gerekli sayıda hücre hesaplandıktan sonra (96 kuyu, 2×10^3 hücre/kuyu), yeterli miktarda hücreyi içeren hacim süspansiyondan alınıp 10 ml'ye medyumla tamamlandı. 96 kuyucuklu plakada her kuyucuğa hücre süspansiyonundan 0,1 ml eklendi. Luzindol (10^{-6} ila 10^{-3} M), melatoninden 30 dakika önce eklendi daha sonra melatonin (10^{-6} M) eklendi ve 24 saat inkübatörde bırakılmıştır. Bu süre sonunda aşağıda belirtilen ölçümler yapıldı.

MTT Sitotoksite Ölçümleri

MTT 5 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde PBS içinde çözülerek stok MTT solüsyonu hazırlanmıştır. Çalışma solüsyonu ise stok çözeltiden 1:9 oranında FBS ile seyreltilerek elde edilmiştir. Plakalara ekilen HUVEC hücreleri 24 saat test maddeleri ile inkübasyon periodunun ardından, hazırlanan 0,5 mg/ml MTT çalışma çözeltisinden 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde eklendi ve 4 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda plakalardaki kuyucuklarda dibe çökmüş olan formazan kristalleri görüldü. Kuyucuklardan çöktelinin üstünde kalan medyum kısmı uzaklaştırıldı. Dipte kalan mor renkli formazan kristallerini çözmek amacıyla her kuyuya 200 µl DMSO eklendi. Eklenen DMSO çok kanallı

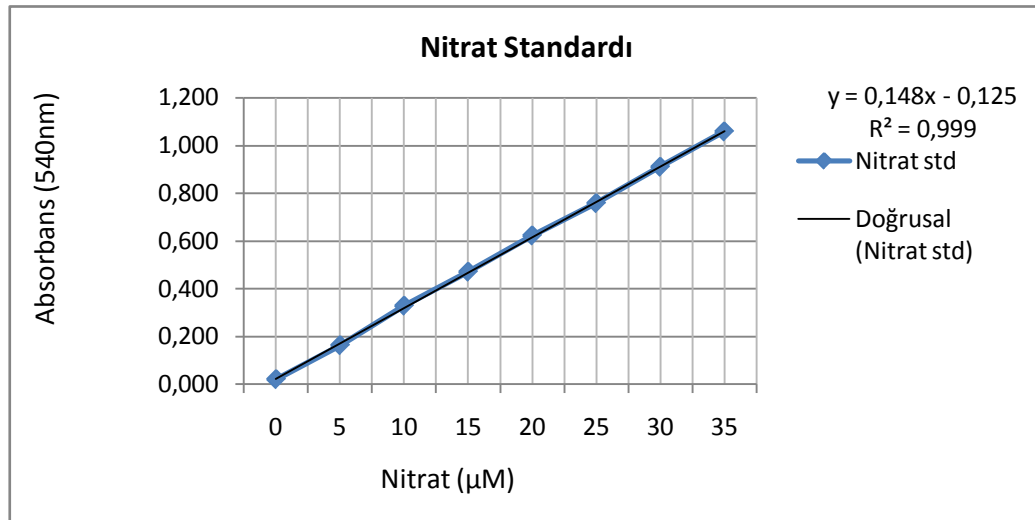
pipetör ile homojen hale getirildi. Daha sonra ELISA'da 540 nm dalga boyunda optik dansiteleri okutuldu (Horakova 2001).

Total Nitrit+ Nitrat Miktar Tayini

Plakalara ekilen HUVEC hücreleri 24 saat test maddeleri eklenerek bekletildikten sonra, nitrit+nitrat miktar tayini yapıldı, bunun için *Nitrit/Nitrat Colorimetric Assay Kit* (Cayman) kullanıldı, üreticinin önerdiği prosedür izlendi. Bunun için sırayla nitrat/nitrit ölçüm tamponu, nitrat redüktaz enzim preparatı, nitrat redüktaz kofaktör preparatı, nitrat standardı, Griess reaktifi R1 ve R2 solüsyonları deneyden önce hazırlandı. 96 kuyucuklu plakada iki kuyucuk kör (*blank*) olarak ayrıldı ve bu kuyucuklara yalnız 200 µl ölçüm tamponu konmuştur. Kör kuyucukların dışında 16 kuyucuk; 2 tekrar olacak şekilde nitrat standardı hazırlamak üzere kullanıldı. Daha sonra nitrat standartlarına ait grafik, aşağıdaki tabloya uygun şekilde elde edildi.

Çizelge 3: Nitrat Standart Seri Çözeltileri Oluşturulurken Kullanılan Nitrat Standardı ve Ölçüm Tamponu Miktarı

Kuyucuk	Nitrat Standardı (µl)	Ölçüm Tamponu (µl)	Final Nitrat Derişimi (µM)
A1, A2	0	80	0
B1, B2	5	75	5
C1, C2	10	70	10
D1, D2	15	65	15
E1, E2	20	60	20
F1, F2	25	55	25
G1, G2	30	50	30
H1, H2	35	45	35



Şekil 11. Artan Konsantrasyonda Nitrat Standardı ile Elde Edilen Absorbans Değerleri ve Grafığe Ait Doğru Denklemi

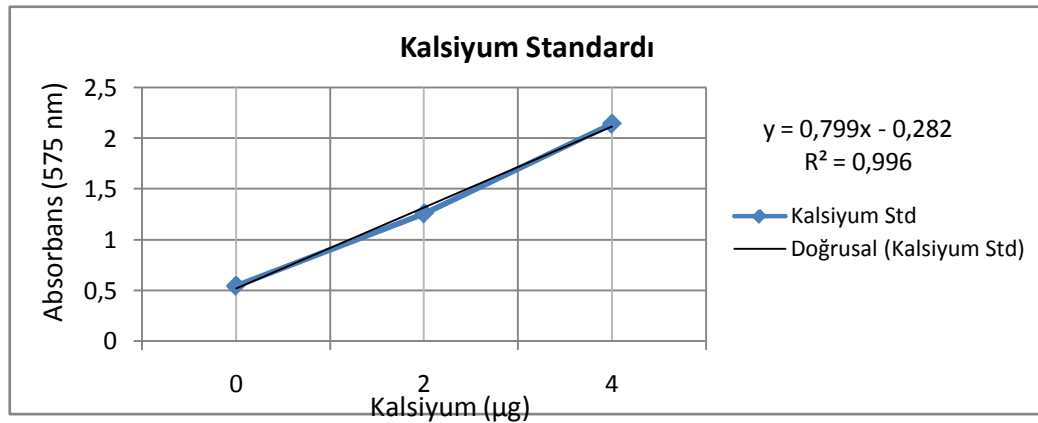
Daha sonra diğer kuyucuklara, önceden test maddeleri ile inkübe edilmiş olan HUVEC hücreleri içeren kuyucuklardan alınan 80 µl medyum konuldu. Standart nitrat içeren kuyucuklar ve test kuyucuklarına 10 µl enzim kofaktör karışımından ve 10 µl nitrat redüktaz karışımından eklendi. Plaka 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda kuyulara 50 µl Griess R1 reaktifi ve hemen arkasından Griess R2 reaktifi eklendi. Renk oluşumu için 10 dakika oda sıcaklığında beklendi ve ELİSA'da 540nm'de okutuldu. Nitrat miktarları standart eğrisi kullanılarak hesaplandı.

Kalsiyum (Ca²⁺) Miktar Tayini

Kalsiyum miktar tayini *BioVision Calcium Colorimetric Assay Kit* kullanılarak yapıldı ve üreticiye ait protokol izlendi. Bu kit kullanılarak yapılan ölçümler kalsiyum iyonlarıyla *O-cresolphthalein* arasında oluşan kromojenik kompleks oluşumuna dayanmaktadır. Nitrat Ölçümünde olduğu gibi burda da bir standart oluşturulmaktadır.

Çizelge 4: Kalsiyum Standart Seri Çözeltileri Oluşturulurken Kullanılan Kalsiyum Standardı ve Final Kalsiyum Derişimi

Kuyucuk	Dilue edilmiş Kalsiyum Standardı 5 mM (µl)	Distile su (µl)	Final Kalsiyum Derişimi (µg)
A1, A2	0	50	0
B1, B2	2	48	0,4
C1, C2	4	46	0,8
D1, D2	6	44	1,2
E1, E2	8	42	1,6
F1, F2	10	40	2,0



Şekil 12. Artan Konsantrasyonda Kalsiyum Standardıyla Elde Edilen Absorbans Değerleri ve Grafiğe Ait Doğru Denklemi

Kalsiyum standartları yukardaki tabloya göre hazırlandı. Test kuyucuklarına ise 50 µl medyum kondu. Daha sonra 90 µl kromojenik reajan örneklere, standartlara ve kontrollere eklendi ve hafifçe karıştırıldı. 60 µl kalsiyum ölçüm tamponu her kuyuya eklendi ve hafifçe karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika beklendi. OD 575 nm'de okundu.

Sonuçların Analizi

Çalışma sonucu elde edilen bulgular, aorta deneylerinde en az 6 kere tekrarlanmış deney sonucunun ortalaması, HUVEC deneylerinde ise en az 3 deney sonucunun ortalaması olarak sunuldu. O.D. ± SEM (ortalama değer ± Standart hatanın ortalaması) ile birlikte gösterildi. Damar yanıtlarının değerlendirilmesinde deney gruplarının birbirinden farklarının istatistiksel analizi, 40mM KCl ile tek konsantrasyon elde edilen cevaplar için tek yönlü ANOVA varyans analizi ve ardından Tukey testi gerçekleştirildi; Diğer kümülatif konsantrasyon yanıt eğrileri içinse çift yönlü varyans analizi ve ardından Bonferroni Çoklu Karşılaştırma Testi yapıldı. HUVEC ile gerçekleştirdiğimiz deneylerde ise çift yönlü varyans analizi ve ardından Bonferroni Çoklu Karşılaştırma Testi yapıldı. İstatistiksel analizlerde elde edilen anlamlılık değerleri $p<0,05$; $p<0,01$ ve $p<0,001$ olacak şekilde verildi.

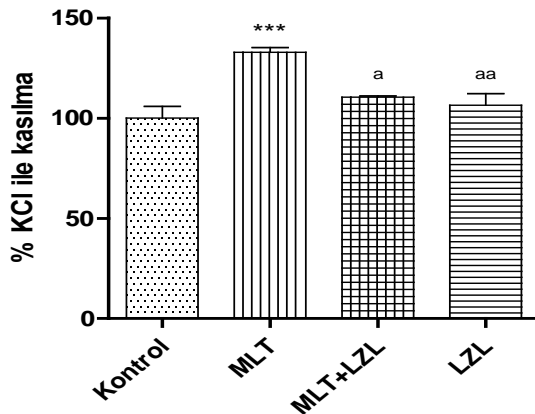
Deneysel Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarının, Deneysel hayvanları biriminin ve Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezi'ne (BİBAM'a) ait laboratuvar imkanlarından ve alt yapısından faydalanarak yapıldı.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Melatonin, başlıca pineal bezde sentezlenen ve serumdaki miktarı fotoperiodik olarak değişen bir hormondur. Serumda bulunan melatonin damarlar yoluyla organizma içinde dağılırken, vasküler sistemin kendisini de etkilemektedir.

Endotelli Sıçan Torasik Aortasında Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

Potasyum Klorür (40 mM) Kasılma Yanıtları Yüzdeleri



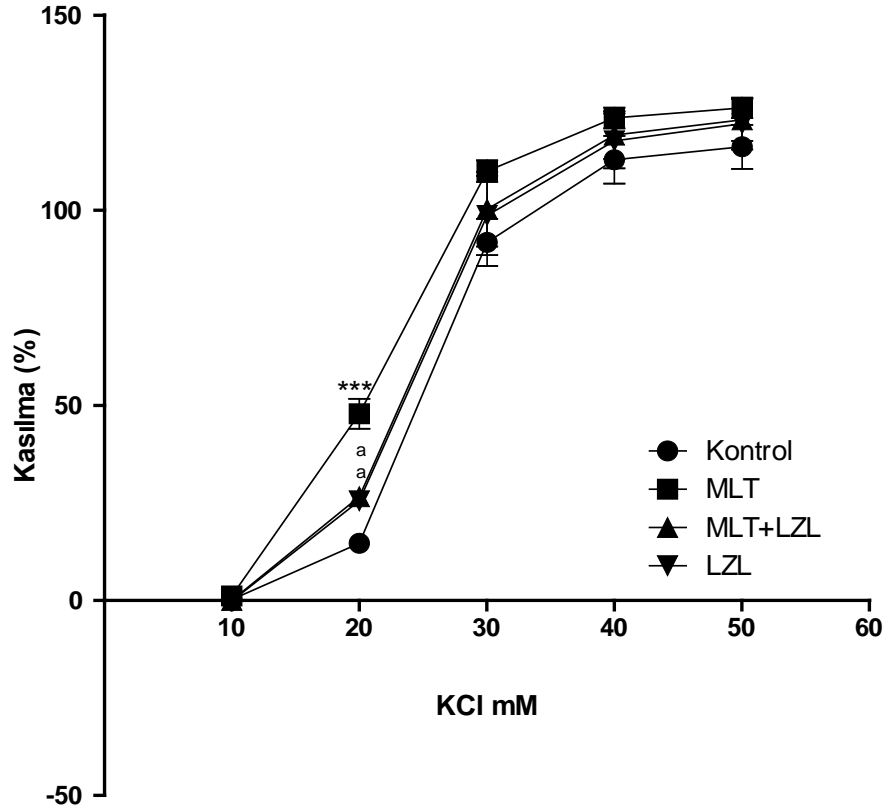
Şekil 13. Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında KCl (40mM) ile Kasılma Yanıtları Yüzdeleri. Kontrole Göre Anlamlılık Farklılık, *** $p<0,001$; MLT Grubuna Göre Anlamlılık Farklılık ^a $p<0,05$; ^{aa} $p<0,05$; (n:6). O.D. ± S.H.O. Tek Yönlü Varyans Analizi, Takiben Tukey'in Çoklu Karşılaştırma Testi

Bu deneylerde kontrol grubuna nazaran yalnız melatonin, yalnız luzindol ve melatonin ve luzindol birlikte kombinasyonu ile inkübasyonun 40mM KCl yanıtlarına etkisi incelenmiştir. Aortada protein ve reseptör seviyesinde varlığı kanıtlanan tek melatonin reseptör alt tipi MT1 reseptörüdür. MT1 reseptörüne selektif bir antagonist bulunmamaktadır fakat MT1/MT2 reseptör antagonist olan luzindol bilinmektedir. MT2 reseptörünün bulunmadığı bu durumda luzindol yalnız MT1 reseptör antagonisti olarak davranmaktadır.

Yalnız melatonin (10^{-5} M) ile inkübasyon yapılan aorta MLT olarak, melatonin (10^{-5} M) ve luzindol (10^{-5} M) ile ön inkübasyon yapılan aorta MLT+LZL olarak, yalnız luzindol ile inkübasyon yapılan aorta LZL olarak adlandırılmıştır. 40mM KCl ile görülen kasılma yanıtı bakımından MLT grubunda kontrole göre anlamlı farklılık gözlenmiştir (***) $p < 0,001$). Yine MLT+LZL grubunda kontrole göre anlamlı farklılık gözlenmiştir (* $p < 0,05$). Tek konsantrasyon verilen KCl, LZL grubunda kontrole göre anlamlı farklılık oluşturmuştur (* $p < 0,05$). MLT+LZL grubunda da MLT grubuna göre anlamlı farklılık görülmüştür (^a $p < 0,05$). Aynı şekilde LZL grubunda MLT grubuna göre anlamlı farklılık gözlenmiştir (^a $p < 0,05$).

Bu deneylerde MT1 reseptörünün KCl ile kasılma yanıtlarında etkili olup olmadığını anlamak amacıyla luzindol kullanılmıştır. Kontrole nazaran melatonin uygulanan aorta kesitlerinde 40mM KCl ile oluşan kasılma yanıtlarının %25 arttığı görülmektedir. Kontrol grubuna ait maksimum kasılma yanıtları 1564 ± 74 g, melatonin inkübasyonu yapılan grupta maksimum kasılma 2257 ± 77 g olarak bulunmuştur. Luzindol tek başına KCl uygulamasından 20 dakika önce banyoya eklenmiştir ve KCl ile kontrol grubundaki kasılmadan fazla fakat yalnız melatonin ile olan kasılmadan daha az bir kasılma yanıtına neden olmuştur. Luzindol ve melatonin birlikte uygulandığında (luzindol KCl'den 20 dakika önce, melatonin KCl'den 5 dakika önce) ise tek başına luzindol ile elde edilen sonuca benzer bir kasılma elde edilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar Lartaud ve arkadaşlarının 2007'de yaptıkları benzer bir çalışma ile çelişmektedir (Lartaud ve ark., 2007), 40mM KCl uyguladığı endotelsiz aorta halkalarını 20 dakika tek başına melatonin ile ve melatonin artı luzindol ile inkübe etmiş ve kontrole göre bir fark gözlememiştir. Bizim çalışmamızda ise melatonin KCl uygulamasından hemen önce organ banyosuna eklenmiş ayrıca endotelli aorta kesitleri kullanmıştır. Bu sonuçlar arasındaki fark endotelle ilişkili olabilir çünkü MT1 reseptörlerinin çoğunlukla *Tunica adventida*'da yani endotelde yer almaktadır (Schepelmann ve ark., 2011).

Kümülatif Potasyum Klorür (10-50mM) ile Kasılma Yanıtları Yüzdeleri



Şekil 14. Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında Yüzde KCl Konsantrasyon Yanıt Eğrisi. Kontrolle Göre Anlamlılık Farklılık, *** $p < 0,001$; MLT Grubuna Göre Anlamlılık Farklılık ^a $p < 0,05$; Veriler: O.D. \pm S.H.O. Tek Yönlü Varyans Analizi, Takiben Tukey'in Çoklu Karşılaştırma Testi ($n:6$).

Kontrol, yalnız melatonin (10^{-5} M), yalnız luzindol (10^{-5} M) ve melatonin (10^{-5} M) ve luzindol (10^{-5} M) kombine grubuna KCl 10-50 mM konsantrasyonda uygulanmıştır. Bu deneyler sonucunda 20mM KCl ile elde edilen yanıtlarda melatonin ile inkübe edilen grup kontrole göre KCl ile kasılma yanıtında anlamlı artış göstermiştir (***) $p < 0,001$). Melatonin ve luzindol birlikte verilen grup kontrole göre anlamlı fark ortaya koymamıştır ancak yalnız melatonin verilen gruba göre KCl kasılma yanıtında anlamlı azalmaya neden olmuştur (^a, $p < 0,05$). Yalnız luzindol verilen grupta aynı şekilde yalnız melatonin verilen gruba kıyasla daha az kasılma yanıtına neden olmuştur (^a, $p < 0,05$). Kümülatif potasyum klorür uygulanan aortadan elde ettiğimiz veriler, tek konsantrasyon potasyum klorür ile elde edilen verilerle uygunluk göstermektedir ancak KCl miktarı arttıkça gruplar arası anlamlılık farkları kaybolmaktadır.

Melatoninin kaudal arterde ve sıçan aortasında tek başına vazoaktif etkili olmadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Evans ve ark., 1992; Krause ve ark. 1995; Viswanathan ve ark., 1990; Monroe ve Watts, 1998). Kaudal arterde ise adrenerjik stimülasyonla oluşan kasılma yanıtlarını MT1 reseptörleri aracılığıyla artırdığı ve MT2 reseptörleri aracılığıyla baskıladığı gösterilmiştir (Evans ve ark. 1992; Krause ve ark., 1995; Masana ve ark., 2002; Dubocovich ve ark., 2010). Ancak melatoninin tavşan ana arterinde (10^{-5} ila 10^{-3} M) ve sıçan aortasında (10^{-6} ila 10^{-3} M) KCl ile oluşan kasılmayı azalttığı gösteren çalışmalar bulunmaktadır

(Satake ve ark., 1991a; Weekley ve ark. 1991).). KCl ile prekontraksiyondan önce verilen melatonin ile oluşan gevşemenin, luzindol ile geri çevrilemediğini gösteren bir çalışma bulunmaktadır fakat bu çalışmanın grafiklerinde çözücü ile de gevşeme oluştuğu görülmektedir (Monroe ve Watts, 1998). Ayrıca çok sayıda çalışma melatoninin iNOS ekspresyonunu baskıladığını göstermektedir (Tamura ve ark., 2006; Lartaud ve ark., 2007; Silva ve ark. 2007).

Çizelge 5. Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında KCl Konsantrasyon Yanıt Eğrisinden Elde Edilen LogEC₅₀ Değerleri

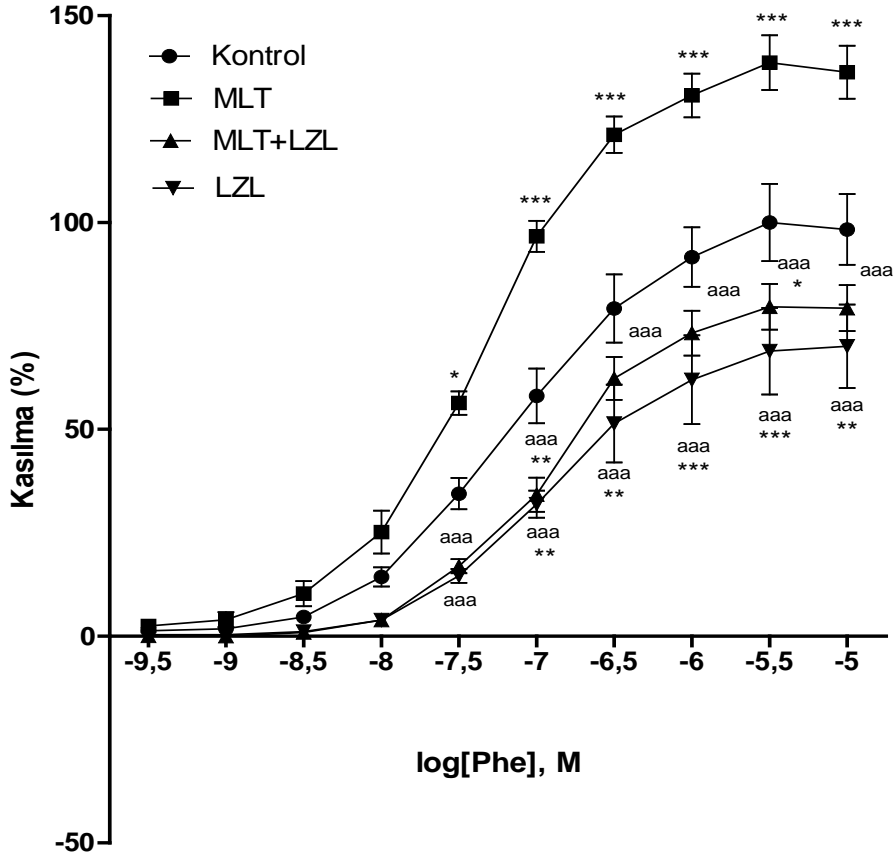
KCl	Kontrol	MLT	MLT+LZL	LZL
EC ₅₀	29,43±0,138	20,19±0,071	20,52±0,182	20,53±0,203
Anlamlılık	-	***	***,a	***,a

Kontrol: kontrol aortası, MLT: yalnız melatonin (10^{-5} M) ile ön inkübasyon yapılan aorta, MLT+LZL: melatonin (10^{-5} M) ve luzindol (10^{-5} M) ile ön inkübasyon yapılan aorta, LZL: yalnız luzindol ile inkübasyon yapılan aorta. Kontrole göre anlamlı farklılık *** $p<0,01$; MLT grubuna göre anlamlı farklılık ^a $p<0,05$ (n:6) Veriler O.D. ± S.H.O. olarak verilmiştir. Tek yönlü varyans analizi, takiben Tukey'in çoklu karşılaştırma testi.

Kümülatif Fenilefrin (3×10^{-9} - 10^{-5} M) Kasılma Yanıtları Yüzdeleri

Bu deneylerde kontrol grubu ile MLT, LZL ve MLT+LZL inkübasyonu yapılan gruplar, kümülatif Phe yanıtları bakımından karşılaştırılmıştır.

Sağlıklı Wistar sıçanlardan çıkarılan endotelli torakal aortalar organ banyosuna asılı olarak bu deneyler gerçekleştirilmiştir. Melatonin (10^{-5} M) Phe uygulamasından 5 dakika önce banyoya eklenmiş ve deney süresince ortamda bulunmuştur. Grafikten elde edilen anlamlılıklar şöyle sıralanabilir: 3×10^{-7} M konsantrasyonda kontrole göre MLT grubunda anlamlı farklılık * $p<0,05$; 10^{-7} , 3×10^{-6} , 10^{-6} , 3×10^{-5} , 10^{-5} M konsantrasyonlarda kontrole göre MLT grubunda anlamlı farklılık *** $p<0,001$; 3×10^{-7} , 10^{-7} , 3×10^{-6} , 10^{-6} , 3×10^{-5} , 10^{-5} M konsantrasyonlarda MLT+LZL grubunda MLT grubuna göre anlamlı farklılık ^{a a a} $p<0,001$; 10^{-7} M konsantrasyonda MLT+LZL grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ** $p<0,01$; 3×10^{-5} M konsantrasyonda MLT+LZL grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık * $p<0,05$; 3×10^{-7} , 10^{-7} , 3×10^{-6} , 10^{-6} , 3×10^{-5} , 10^{-5} M konsantrasyonlarda LZL grubunda MLT grubuna göre anlamlı farklılık ^{aaa} $p<0,001$; 10^{-7} , 3×10^{-6} , 10^{-5} M konsantrasyonda LZL grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ** $p<0,01$; 10^{-6} , 3×10^{-5} M konsantrasyonlarda LZL grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık *** $p<0,001$.



Şekil 15. Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında Kümülatif Phe Konsantrasyon Yanıt Eğrisi. Kontrolle Göre Anlamlılık Farklılık, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; MLT Grubuna Göre Anlamlılık Farklılık ^a $p < 0,05$; ^{aaa} $p < 0,01$; ^{aaaa} $p < 0,001$. Veriler: O.D. \pm S.H.O. Tek Yönlü Varyans Analizi, Takiben Tukey'in Çoklu Karşılaştırma Testi ($n:6$).

Kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisinde melatonin inkübasyonu adrenerjik stimülasyonla oluşan kontraksiyonu (Phe 10^{-7} , 3×10^{-6} , 10^{-6} , 3×10^{-5} M, 10^{-5} M) kontrole göre anlamlı şekilde artırmıştır (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Yapılan bir çalışmada, endoteli çıkartılmış sıçan aortasının bir kültür medyumunda (DMEM) inkübasyon yaşanmaya benzer etkiler ortaya çıkarmaktadır bunlar oksidatif stresin artması, NO aracılı gevşemenin artışına bağlı inflamasyon, vazokonstrüktör ajanlara arterial duyarlılığın azalması olarak sıralanmaktadır (Lartaud ve ark., 2007). Üç gün DMEM içinde bekletilen aorta kesitlerinde iNOS ekspresyonunun arttığı ve NE ile kontraksiyonun azaldığı gözlenmiştir (Lartaud ve ark., 2007). Üç gün DMEM ve 10^{-5} M melatonin ile inkübe edilen endotelsiz sıçan aortasında NE aracılı kasılma kontrole göre tamamen düzelmiştir. 2×10^{-6} M luzindol varlığında ise melatonin ile düzelen kasılma yanıtları yeniden bozulmuştur. Üç gün DMEM ile inkübe edilen aortalarda iNOS ekspresyonu artmış, üç gün melatonin ve DMEM içinde inkübasyon edildiğinde ise iNOS ekspresyonu azalmıştır. 10^{-5} M Melatonin ayrıca katalaz aktivitesini artırmıştır. Sonuç olarak melatonin DMEM inkübasyonu ile ortaya çıkan NE aracılı kontraksiyon kaybını reseptörleri üzerinden etki göstererek düzeltmiştir (Lartaud ve ark., 2007). Endotelsiz sıçan aortası kullanarak yapılmış bu çalışmada DMEM içinde inkübasyon yapılmayan kontrol aortasında 10^{-8} M veya 10^{-5} M melatonin inkübasyonundan sonra 3×10^{-5} M Phe ile kontraksiyon yanıtları kontrole göre bir

artış ortaya çıkarmış ama anlamlı fark elde edilememiştir (Lartaud ve ark., 2007). Bizim çalışmamız ile Lartaud ve ark. (2007) yaptığı bu çalışma arasındaki en büyük fark, bizim çalışmamızda aortanın endotelli olmasıdır. Endotel tabakası çıkarıldığında melatoninin sıçan aortasında Phe kasılmasını potansiyelize eden etkisi azalmış olabilir, çünkü MT1 reseptörleri sıçan aortasında özellikle endotelde yoğunlaşmaktadır.

Doolen ve ark. (1998) yaptığı bir çalışmada ise, Phe ile kontrakte edilen endoteli çıkarılmış olan izole sıçan kaudal aterlerine artan konsantrasyonda (10^{-10} ila 10^{-5} M) melatonin eklemiştir. Melatonin 10^{-10} ila 10^{-7} M konsantrasyonda Phe ile oluşturulan kontraksiyonu konsantrasyona bağımlı şekilde potansiyelize etmiş, 10^{-7} ila 10^{-5} M arasındaki daha yüksek melatonin konsantrasyonunda ise potansiyelize edici azalmıştır. Phe ile ön kontraksiyon sağlandıktan sonra ortama 4P-PDOT (3×10^{-6} M) eklenmiş ve artan konsantrasyonda melatonin verilmiştir. 4P-PDOT melatoninin düşük konsantrasyonlarında 10^{-10} ila 10^{-7} M kontraksiyonu hafifçe artırmış, fakat yüksek konsantrasyonlarında 10^{-7} ila 10^{-5} M tam tersi kasılmayı azaltmıştır. Bu sonuçlara dayanarak endotelsiz sıçan kaudal arterinde MT2 reseptörünün melatonin ile gözlenen vazodilatör etkiye aracılık ettiği sonucuna ulaşılmıştır (Doolen ve ark., 1998).

Sewerynek (2002) hazırladığı *review*'de sistemik olarak verilen melatonin ile gözlenen kan basıncını düşürücü etkinin kaynaklanabileceği mekanizmalar şöyle sıralanmaktadır:

- 1) melatoninin hipotalamus üzerinde direkt etkisi
- 2) antioksidan özelliğine bağlı olarak kan basıncını düşürücü etki
- 3) melatoninin katekolaminlerin miktarını azaltıcı etkisi veya
- 4) aorta duvarında yer alan düz kasların gevşemesine bağlı görülen etki (Sewerynek, 2002).

Melatoninin sistemik olarak verilışinden sonra gözlenen kan basıncını düşürücü etkinin aortada bulunan MT1 reseptörüne bağlı olmadığı, aksine MT1 reseptörü aracılığıyla melatoninin aortada adrenerjik vazokonstrüksiyonu artıran bir etki gösterdiği çalışmamızın sonuçlarına dayalı olarak söylenebilir.

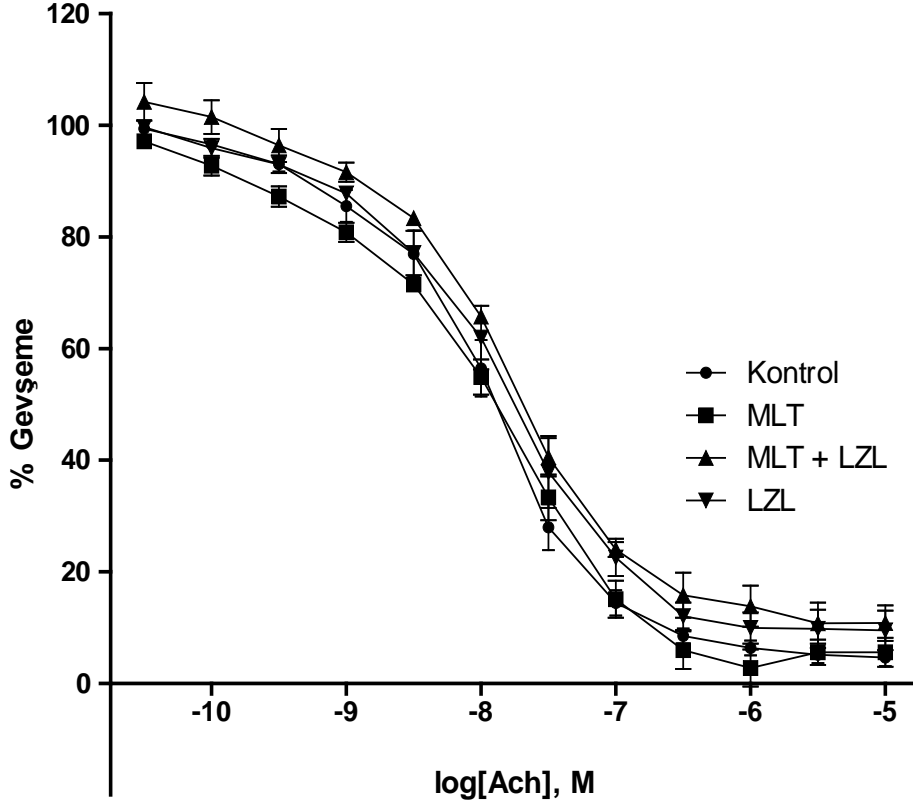
Çizelge 6. Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında Kümülatif Phe Konsantrasyon Yanıt Eğrisinden Elde Edilen pD_2 Değerleri.

Phe	Kontrol	MLT	MLT+LZL	LZL
pD₂	7,161±0,093	7,34±0,049	6,922±0,071	6,915±0,14
Anlamlılık		*	**,aaa	**,aaa

Kontrol: kontrol aortası, MLT:yalnız melatonin (10^{-5} M) ile ön inkübasyon yapılan aorta, MLT+LZL: melatonin (10^{-5} M) ve luzindol (10^{-5} M) ile ön inkübasyon yapılan aorta, LZL: yalnız luzindol ile inkübasyon yapılan aorta. Kontrole göre anlamlı farklılık * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, MLT grubuna göre anlamlı farklılık ^{a a a} $p < 0,001$. Veriler O.D. ± S.H.O. Tek yönlü varyans analizi, Tukey'in çoklu karşılaştırma testi (n:6).

LZL ilavesiyle kontrol grubuna göre daha da düşen EC_{50} değerlerinin ortaya çıkmasında rol olan mekanizmalar ise daha fazla çalışma yapılarak aydınlatılmalıdır.

Kümülatif Ach (3×10^{-10} - 10^{-5} M) Gevşeme Yanıtları Yüzdeleri



Şekil 16. Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında Phe (10^{-5} M) İle Ön Kasılmanın Ardından Uygulanan Kümülatif Ach ile Gevşeme Yanıtları Yüzdeleri. Veriler O.D. \pm S.H.O Olarak Verilmiştir. İki Yönlü Varyans Analizi, Takiben Bonferroni Çoklu Karşılaştırma Testi.

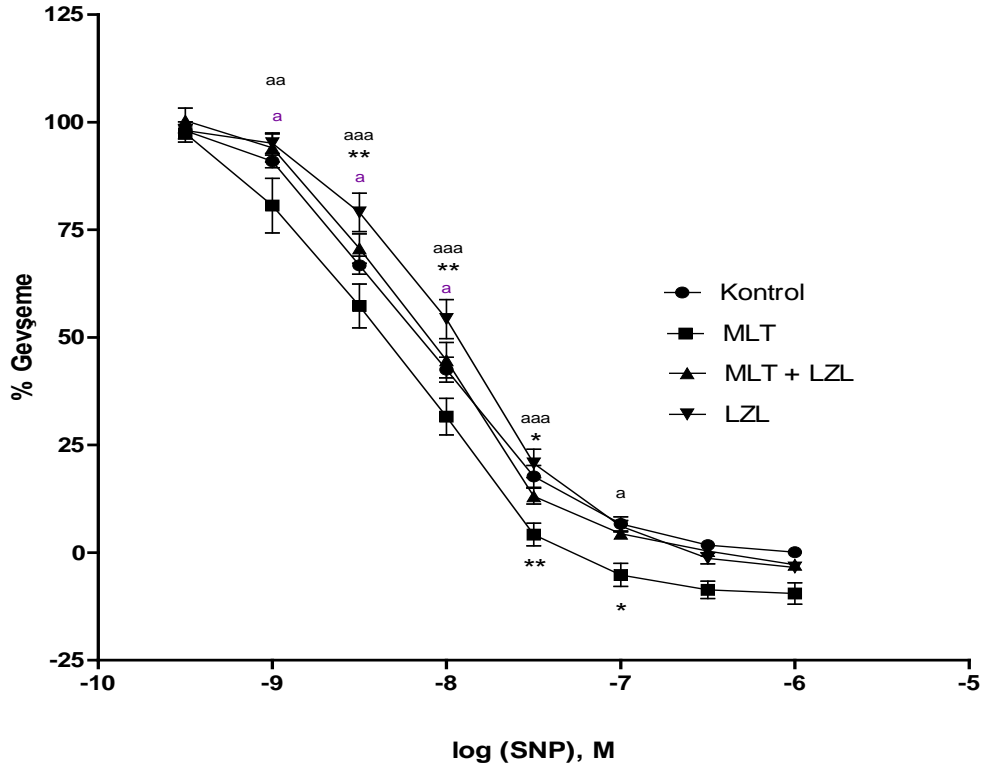
Sağlıklı Wistar sıçanlardan çıkarılan endotelli torasik aorta kullanılarak bu deneyler gerçekleştirilmiştir. Melatonin (10^{-5} M), Phe uygulamasından hemen önce banyoya eklenmiş ve deney süresince ortamda bulunmuştur. 10^{-5} M Phe ile ön kasılma %100 kabul edilerek gevşemeler bu kasılmaya göre % olarak hesaplanmıştır. Paskaloğlu ve ark. (2004) yaptığı, sağlıklı Wistar sıçanlarla, insülin verilen diyabetik sıçanlar ve insülin ve melatonin (8 hafta boyunca; 10mg/kg/gün; i.p.) verilen diyabetik sıçanlardan elde edilen kümülatif Ach gevşemesi bakımından bizim çalışmamızla uyumlu şekilde hiçbir anlamlılık elde edilmemiştir. Giraourd ve ark. (2001) yaptığı bir çalışmada hipertansif (HS) ve normotansif sıçanlara (NS) 4 hafta boyunca 30 mg/kg/gün melatonin verilip ortama arter basınçları (OAB), kalp atım hızları (KH), Sistolik (SKB) ve diastolik kan basınçları (DKB) ölçülmüştür. HS'larda OAB, SKB, DKB ve KH anlamlı olarak azalmıştır. Melatonin tedavisi HS ve NS larda Ach ile oluşan gevşemede hafif bir artış olduğu belirtilmiştir (Girouard ve ark., 2001).

Çizelge 7. Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında Fenilefrin ile Ön Kasılmanın Ardından Kümülatif Ach Konsantrasyon Yanıt Eğrisinden Elde Edilen pD_2 Değerleri

Ach	Kontrol	MLT	MLT + LZL	LZL
pD_2	$7,93 \pm 0,04$	$7,87 \pm 0,05$	$7,85 \pm 0,05$	$7,83 \pm 0,06$

Kontrol: kontrol aortası (n:8), MLT:yalnız melatonin (10^{-5} M) ile ön inkübasyon yapılan aorta (n:6), MLT+LZL: melatonin (10^{-5} M) ve luzindol (10^{-5} M) ile ön inkübasyon yapılan aorta (n:5), LZL: yalnız luzindol ile inkübasyon yapılan aorta (n:5). Veriler O.D. \pm S.H.O. olarak verilmiştir. Tek yönlü varyans analizi ardından Tukey'in çoklu karşılaştırma testi.

Kümülatif SNP (3×10^{-9} - 10^{-5} M) Gevşeme Yanıtları Yüzdeleri



Şekil 17. Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında (10^{-5} M) Phe ile Ön Kasılmanın Ardından kümülatif SNP Yanıtlarının Yüzdeleri. Kontrole Göre Anlamlılık Farklılık, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; MLT Grubuna Göre Anlamlılık Farklılık ^a $p < 0,05$; ^{aa} $p < 0,01$; ^{aaa} $p < 0,001$. Veriler: O.D. \pm S.H.O. Tek Yönlü Varyans Analizi, Takiben Tukey'in Çoklu Karşılaştırma Testi (n:6).

Sağlıklı Wistar sıçanlardan çıkarılan endotelli torasik aorta kullanılarak bu deneyler gerçekleştirilmiştir. Melatonin (10^{-5} M) Phe uygulamasından hemen önce banyoya eklenmiş ve deney süresince ortamda bulunmuştur. 10^{-5} M Phe ile ön kasılma %100 kabul edilerek gevşemeler bu kasılmaya göre % olarak hesaplanmıştır. Phe ile ön kasılma sağlandıktan sonra inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar şöyledir: 3×10^{-7} M SNP ile MLT grubunda kontrole göre anlamlı farklılık $** p < 0,01$; 10^{-7} M SNP ile MLT grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık $* p < 0,05$; 3×10^{-8} M SNP ile LZL grubunda kontrole göre anlamlı farklılık $** p < 0,01$; 3×10^{-7} M SNP ile LZL grubunda kontrole göre anlamlı farklılık $* p < 0,05$; 3×10^{-8} , 10^{-8} ve 3×10^{-7} M SNP ile LZL grubunda MLT grubuna göre anlamlı farklılık $^{aaa} p < 0,001$; 10^{-7} M SNP ile LZL grubunda MLT grubuna göre anlamlı farklılık $^a p < 0,01$; 10^{-9} , 3×10^{-8} ve 10^{-8} M SNP ile MLT+LZL grubunda MLT grubuna göre anlamlı farklılık $^a p < 0,05$.

SNP'in 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-6} , 3×10^{-7} M, 10^{-7} ve 3×10^{-6} M konsantrasyonlarında melatonin varlığı kontrole göre gevşemede anlamlı azalmaya neden olmuştur. Bu sonuç Paskaloglu ve ark. (2004) yaptığı ve sağlıklı Wistar sıçanlara sistemik olarak 10mg/kg/gün konsantrasyonda melatoninin i.p. uygulandığı çalışmada bulunan sonuçlarla uyumludur. Hücre dışından verilen nitrik oksit damar gevşemesini artıran etkisi melatonin tarafından artırılmıştır ve bu artış luzindol ile ortadan kalkmıştır.

Çizelge 8. Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında Fenilefrin ile Ön Kasılmanın Ardından Kümülatif SNP Konsantrasyon Yanıt Eğrisinden Elde Edilen pD2 Değerleri.

SNP	Kontrol	MLT	MLT+LZL	LZL
pD2	8,18±0,03	8,28±0,06	8,15±0,05	7,94±0,05
Anlamlılık		**	aaa	aa, bbb

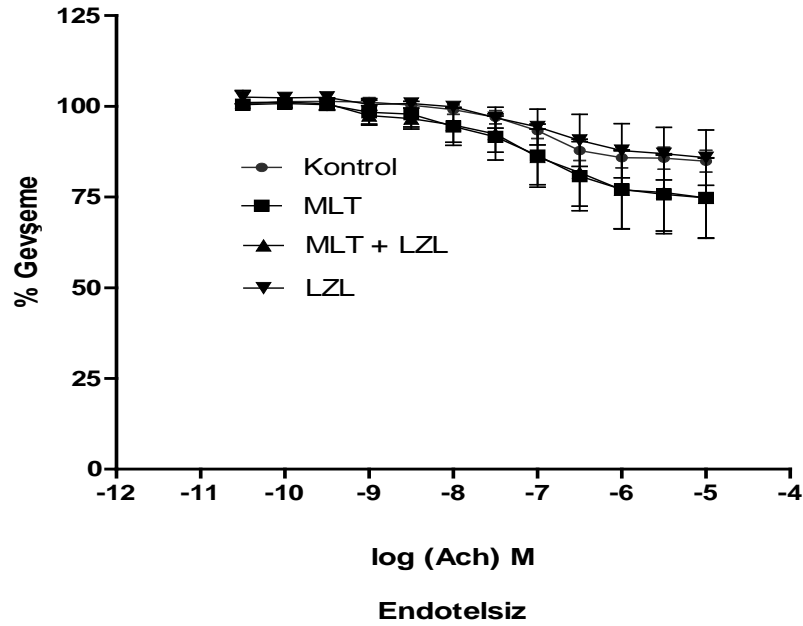
Kontrol: kontrol aortası (n:8), MLT:yalnız melatonin (10^{-5} m) ile ön inkübasyon yapılan aorta (n:6), MLT+LZL: melatonin (10^{-5} m) ve luzindol (10^{-5} m) ile ön inkübasyon yapılan aorta (n:5), LZL: yalnız luzindol ile inkübasyon yapılan aorta (n:5). MLT grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık $** p < 0,01$; MLT+LZL grubunda MLT grubuna göre anlamlı farklılık $^{aaa} p < 0,001$; LZL grubunda MLT grubuna göre anlamlı farklılık $^{aa} p < 0,01$; LZL grubunda MLT+LZL grubuna göre anlamlı farklılık $^{bbb} p < 0,001$. Veriler O.D. ± S.H.O. olarak verilmiştir. Tek yönlü varyans analizi ardından Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

Endotelsiz Sıçan Torasik Aortasında Yapılan Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

Bu deneylerde erkek albino Wistar sıçanlardan çıkarılan torakal aortaların endotel tabakası paslanmaz çelik çubukla damar içi sürtülerek tahrip edilmiştir. Daha sonra endotel yokluğu 10^{-5} M Phe ve ardından 10^{-5} M Ach verilerek belirlenmiştir, yaklaşık % 20 gevşeme cevabı alınan aortalar endotelsiz kabul edilmiştir.

Kümülatif Ach (10^{-10} , 3×10^{-5} M) Gevşeme Yanıtları Yüzdeleri

Endoteli tahrip edilmiş aortalardan elde edilen kümülatif Ach (10^{-10} , 3×10^{-5} M) gevşeme cevapları kıyaslandığında, gruplar arasında hiçbir konsantrasyonda anlamlı fark gözlenmemiştir. Benzer sonuçlar endoteli sağlam aortalarda da gözleendiği için Ach ile elde edilen gevşeme yanıtları üzerinde melatonin ve MT1 reseptörünün etkisi olmadığı sonucuna varılabilir. Aynı şekilde NO aracılı gevşemenin melatonin ve MT1 reseptörü ile aracılığıyla oluşan hücre içi cevaplarda etkili olmadığı görülmektedir.



Şekil 18. Endotelsiz Aortada Yapılan Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında 10^{-5} M Phe ile Ön Kasılmanın Ardından Verilen Kümülatif Ach Yanıt Yüzdeleri. İki yönlü varyans analizi ardından Bonferroni çoklu karşılaştırma testi.

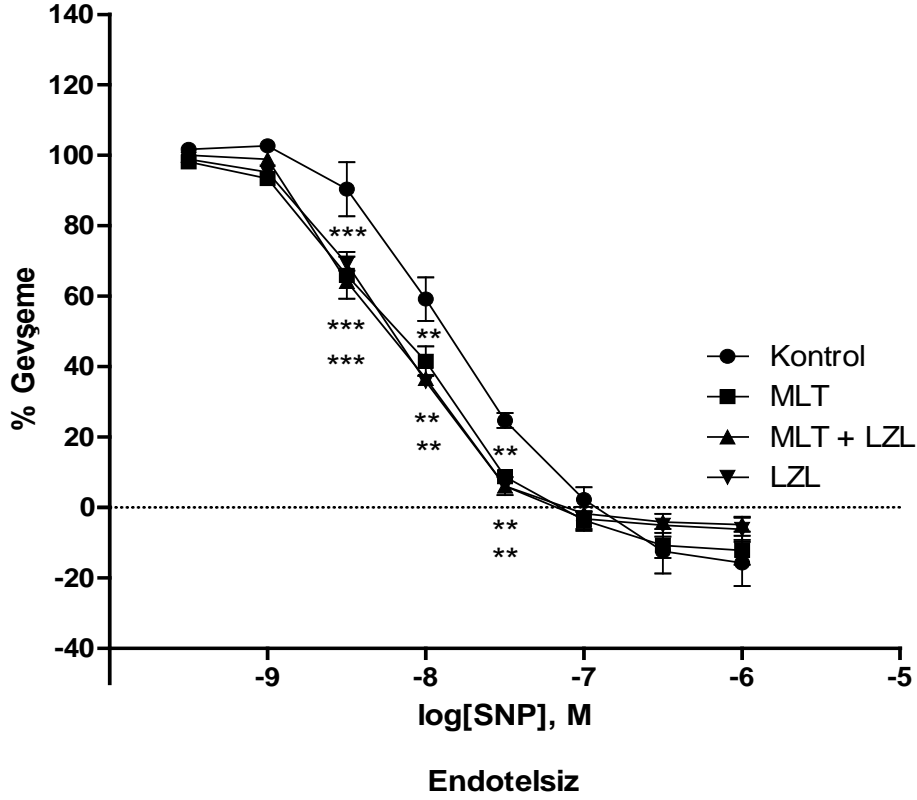
Çizelge 9. Endotelsiz Aortada Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında Fenilefrin İle Ön Kasılmanın Ardından Kümülatif Ach Konsantrasyon Yanıt Eğrisinden Elde Edilen pD_2 Değerleri.

End.siz Ach	Kontrol	MLT	MLT + LZL	LZL
pD_2	$7,02 \pm 0,17$	$7,14 \pm 0,41$	$7,12 \pm 0,39$	$7,02 \pm 0,40$

Kontrol: kontrol aortası, MLT:yalnız melatonin (10^{-5} M) ile ön inkübasyon yapılan aorta, MLT+LZL: melatonin (10^{-5} M) ve luzindol (10^{-5} M) ile ön inkübasyon yapılan aorta (N:5), LZL: yalnız luzindol ile inkübasyon yapılan aorta (n:5). Veriler O.D. \pm S.H.O. olarak verilmiştir. Tek yönlü varyans analizi ardından Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

Kümülatif SNP (10^{-9} - 10^{-6} M) Gevşeme Yanıtları Yüzdeleri

Bu grup deneylerde endotelsiz aortalar kullanılarak kümülatif SNP (10^{-9} - 10^{-6} M) ile konsantrasyon yanıt eğrileri çıkarılmıştır. 3×10^{-8} , 10^{-8} , 3×10^{-7} M SNP ile elde edilen gevşeme cevaplarının kontrol grubunda diğer gruplardan daha az olduğu görülmektedir. Endotelsiz aortada melatonin SNP ile elde edilen gevşeme yanıtlarını artırmış fakat luzindol ile bu etki geri çevrilememiştir. Endotel tabaka çıkartıldığında, luzindol ile melatonin etkisini antagonize eden durum ortadan kalkmaktadır. Endoteli sağlam aortada melatonin varlığında SNP ile gözlenen gevşeme artışı luzindol ile engellenebilirken, endoteli çıkarılmış aortada melatonin varlığında SNP ile gözlenen vazorelaksan etki artışı luzindol ile ortadan kaldırılamamaktadır dolayısıyla vazorelaksan cevabın luzindol ile ortadan kalktığı veya MT1 reseptörünün gevşeme yanıtına engel olduğu düşünülebilir.



Şekil 19. Endotelsiz Aortada Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında 10^{-5} M Phe ile Ön Kasılmanın Ardından Verilen Kümülatif SNP Konsantrasyon Yanıt Yüzdesi. Kontrole Göre Anlamlılık Farklılık, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,01$. Veriler O.D. \pm S.H.O. Olarak Verilmiştir. İki Yönlü Varyans Analizi, Takiben Bonferroni Çoklu Karşılaştırma Testi, (n=6).

Grafikten elde edilen anlamlılıklar şöyle sıralabilir: 3×10^{-8} M SNP ile MLT grubunda kontrole göre anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 3×10^{-8} M SNP ile MLT+LZL grubunda kontrole göre anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 3×10^{-8} M SNP ile LZL grubunda kontrole göre anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 10^{-8} M SNP ile MLT grubunda kontrole göre anlamlı farklılık ** $p < 0,01$; 10^{-8} M SNP ile MLT+LZL grubunda kontrole göre Anlamlı Farklılık ** $p < 0,01$; 10^{-8} M SNP ile LZL grubunda kontrole göre anlamlı farklılık ** $p < 0,01$; 3×10^{-7} M SNP ile MLT grubunda kontrole göre anlamlı farklılık ** $p < 0,01$; 3×10^{-7} M SNP ile MLT+LZL grubunda kontrole göre anlamlı farklılık ** $p < 0,01$; 3×10^{-7} M SNP ile LZL grubunda kontrole göre anlamlı farklılık ** $p < 0,01$.

Çizelge 10. Endotelsiz Aortada Melatonin (10^{-5} M) ve/veya Luzindol (10^{-5} M) Varlığında Fenilefrin ile Ön Kasılmanın Ardından Kümülatif SNP Konsantrasyon Yanıt Eğrisinden Elde Edilen pD2 Değerleri.

End.siz SNP	Kontrol	MLT	MLT + LZL	LZL
pD2	7,77 \pm 0,07	8,10 \pm 0,06	8,26 \pm 0,04	8,21 \pm 0,04
Anlamlılık		***	***	***

Çizelge 10'da elde edilen bulgulara göre MLT grubunda kontrole göre anlamlı farklılık (***) $p < 0,001$); MLT + LZL grubunda kontrole göre anlamlı farklılık (***) $p < 0,001$); MLT+LZL grubunda MLT grubuna göre anlamlı farklılık (^A $P < 0,05$); LZL grubunda kontrole göre anlamlı farklılık (***) $p < 0,001$); LZL grubunda MLT grubuna göre anlamlı farklılık (^a $p < 0,05$); LZL grubunda MLT+LZL grubuna göre anlamlı farklılık (^{bbb} $p < 0,001$), Pd₂ anlamlılıkları tek yönlü varyans analizinin ardından Tukey'in çoklu karşılaştırma testi yapılarak belirlenmiştir (n=5).

HUVEC Hücre Dizisi ile Yapılan Deneylelerden Elde Edilen Bulgular

Daha önce yapılmış olan çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre, HUVEC hücrelerinde PCR analizleri yoluyla, DNA düzeyinde; western blot analizleri yoluyla, protein düzeyinde MT1, MT2, ROR/RZRa ve ROR/RZRb varlığı gösterilmiş ancak ROR/RZRc varlığına rastlanmamıştır. Analizler HUVEC hücrelerinde hem MT1 hem de MT2 reseptörünün belirgin olarak var olduğu fakat ROR/RZR ailesine ait reseptörler arasından yalnız ROR/RZRb'nin ayırt edilebilir miktarda olduğu görülmüştür. Sonuç olarak HUVEC hücrelerinin G-protein bağlı melatonin membran reseptörlerini (MT1 ve MT2) ayrıca nükleer melatonin reseptörlerini (RORa ve RORb, özellikle RORb) bulundurduğu görülmüştür ancak belirgin bir RORc varlığına rastlanmamıştır (Cui ve ark. 2008).

Sıçan aortasında phe ile kasılma deneylerinde ve SNP ile gevşeme deneylerinde endotel tabakanın önemli rolü olduğu görülmektedir, endotel tabakanın melatoninin etkileri bakımından önemini anlamak amacıyla, bir endotel hücresi olan HUVEC üzerinde melatoninin etkileri değerlendirilmiştir. Bu deneylerde hücreler 5 farklı gruba ayrılmıştır, bu gruplar şöyle sıralanabilir; kontrol, melatonin, melatonin ve luzindol, melatonin ve 4P-PDOT, melatonin ve GR135531. Bu gruplar üzerinde MTT sitotoksikite testleri, nitrit/nitrat miktar tayini ve kalsiyum miktar tayini çalışmaları yapılmıştır.

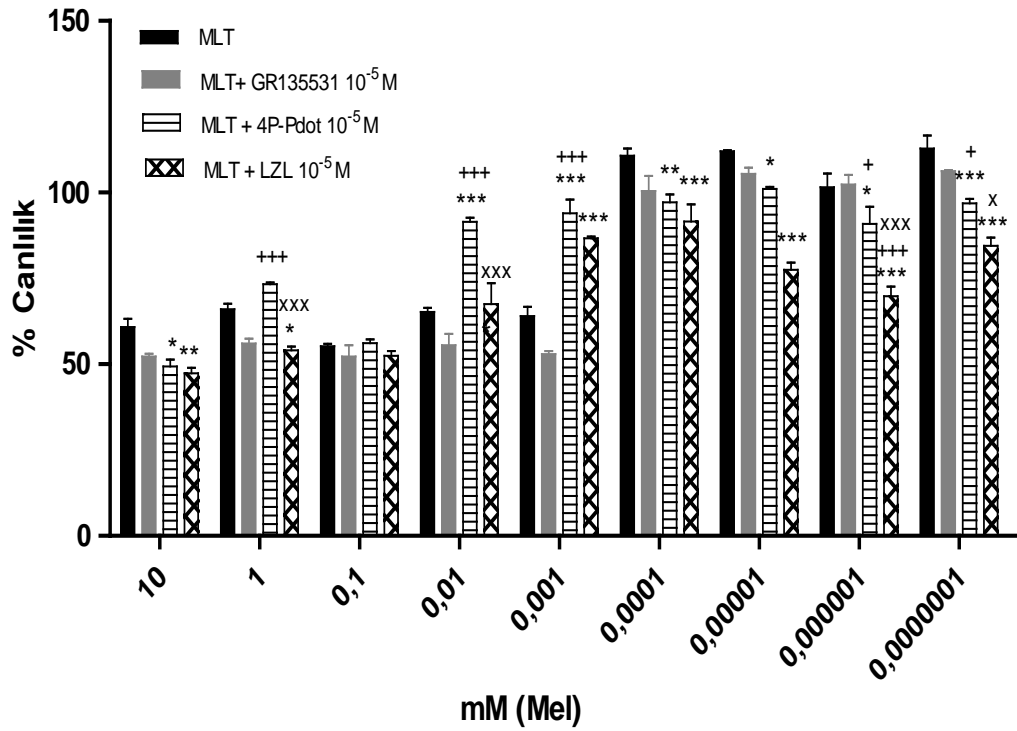
MTT Sitotoksikite Testi Yüzde Canlılık Değerleri

Melatoninin endotel fonksiyonları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yapılan deneylerde HUVEC hücreleri kullanılmıştır. Melatonin 10 ila 10⁻⁷ mM konsantrasyonda 24 saatlik bir inkübasyon süresi boyunca uygulanmış, sitotoksik veya proliferatif konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla MTT testine tabi tutulmuştur ayrıca gözlenen sitotoksik etkilerin hangi reseptörler aracılığıyla ortaya çıktığını bulabilmek amacıyla melatonin ile birlikte luzindol, 4P-Pdot ve GR135531 kombine olarak 10⁻⁵, 10⁻⁶ ve 10⁻⁷ M konsantrasyonlarda HUVEC hücrelerine uygulanmış ve sonuçlar kontrole göre % olarak Şekil 19, 20 ve 21'de sunulmuştur.

10⁻⁵M 4P-Pdot , GR135531 ve LZL ile gerçekleştirilen MTT testleri

Melatonin ile MT1/MT2 reseptörleri aracılığıyla oluşan etkiyi bloke eden luzindol ve MT2 reseptörleri ile oluşan etkiyi bloke eden 4P-PDOT ve QR2 enziminin aktivasyonunu sağlayan GR135531 (MT3 reseptör agonisti) 10⁻⁵ M konsantrasyonda kullanılmıştır. 10⁻² mM melatonin konsantrasyonunda yani kullanılan antagonistlerle melatoninin konsantrasyonunun eşit olduğu durumda melatoninin sitotoksik etkisi büyük ölçüde engellenmiştir. Bu konsantrasyonda 4P-PDOT ile görülen sitotoksik etki blokajı luzindolden fazladır. Bu yüzden 10⁻² mM konsantrasyonda HUVEC hücreleri üzerinde melatoninin sitotoksik etkisi MT2 reseptörleri üzerinden ortaya çıkmaktadır denilebilir. Bütün

konsantrasyonlarda MT2 ile oluşan sitotoksik etkinin MT1 ile gözlenenden daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 20. HUVEC Hücre Dizisine Sırasıyla Melatonin ve Melatonine Eklenen GR 135531 (10⁻⁵ M), 4P-PDOT (10⁻⁵ M), Luzindol (10⁻⁵ M) İnkübasyonu ile Elde Edilen % Canlılık. MLT Grubuna Göre Anlamli Farklilik * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; MLT+GR135531 Grubuna Göre Anlamli Farklilik + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$; MLT+4P-Pdot Grubuna Göre Anlamli Farklilik x $p < 0,05$; xx $p < 0,01$; xxx $p < 0,001$; İki Yönlü Varyans Analizinin Ardından Bonferroni Çoklu Karşılaştırma Testi Yapılmıştır (n:3).

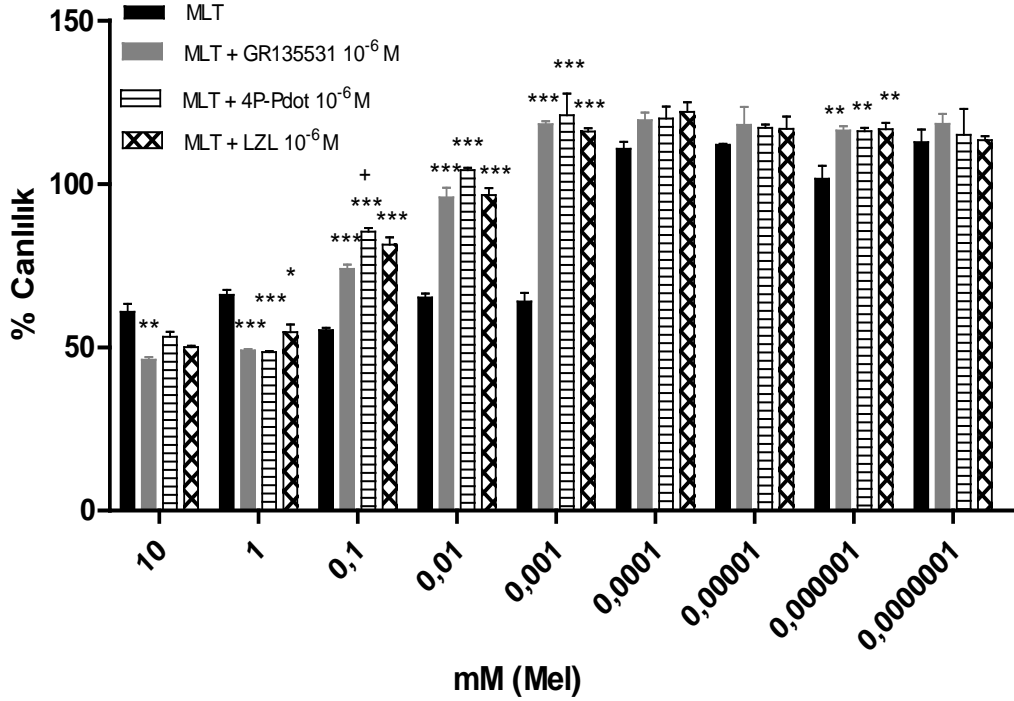
Şekil 20’da bulunan grafiğe göre anlamlılık değerleri şöyle sıralanabilir 10M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık * $p < 0,05$; 10M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık ** $p < 0,01$; 1M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık +++ $p < 0,001$; 1M Konsantrasyonda MLT+4P-PDOT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık xxx $p < 0,001$; 1M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık * $p < 0,05$; 0,01M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 0,01M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık +++ $p < 0,001$; 0,01M konsantrasyonda MLT+4P-Pdot grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık xxx $p < 0,001$; ; 0,001M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 0,001M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 0,001M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık +++ $p < 0,001$; 0,0001M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık ** $p < 0,01$; 0,0001M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 0,00001M MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık * $p < 0,05$;

0,00001M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık *** $p<0,001$. 0,000001 mM konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-PDOT grubunda anlamlı farklılık * $p<0,05$; 0,000001 mM konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+4P-PDOT grubunda anlamlı farklılık + $p<0,05$; 0,000001 mM konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık *** $p<0,001$; 0,000001 mM konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık +++ $p<0,001$; 0,000001 mM konsantrasyonda MLT+4P-PDOT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık +++ $p<0,001$; 0,0000001 mM konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-PDOT grubunda anlamlı farklılık *** $p<0,001$; 0,0000001 mM konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık *** $p<0,001$; 0,0000001 mM konsantrasyonda MLT+gR135531 grubuna göre MLT+4P-PDOT grubunda anlamlı farklılık + $p<0,05$; 0,0000001mM konsantrasyonda MLT+P-PDOT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık x $p<0,05$.

Melatonin 10^{-3} M konsantrasyonlarında canlılığı yaklaşık %50 oranında azaltmıştır, 10^{-3} ila 10^{-7} M konsantrasyonlarda ise canlılık üzerine etkisi belirgin değildir (Şekil 19). 10^{-2} , 10^{-3} M melatonin konsantrasyonlarında görülen sitotoksik etki, 10^{-5} M nonselektif melatonin reseptör antagonisti luzindol ve özellikle MT2 selektif reseptör antagonisti 4P-PDOT tarafından anlamlı şekilde bloke edilmiş ve kontrol seviyelerine ulaşmıştır. 10^{-4} ila 10^{-7} M konsantrasyonda melatonin ise canlılığı kontrol seviyelerinde tutarken, 10^{-5} M LZL veya 10^{-5} M 4P-PDOT ile kombine edildiğinde canlılıkta anlamlı bir azalma görülmektedir. Bu durum melatoninin yüksek konsantrasyonlarda özellikle MT2 reseptörü aracılığıyla sitotoksik etki gösterdiğini ancak düşük konsantrasyonlarda özellikle MT1 reseptörleri aracılığıyla proliferatif etki gösterdiği şeklinde yorumlanabilir. Şekil 19, 20 ve 21'den elde edilen bilgilere dayanarak melatonin ile artan konsantrasyona paralel olarak sitotoksikden proliferatife doğru değişen etkilerin MT2'den MT1'e doğru değişen etkilerle paralel olduğu düşünülebilir.

10^{-6} M 4P-Pdot , GR135531 ve LZL ile gerçekleştirilen MTT testleri

Melatonin ile MT1/MT2 reseptörleri aracılığıyla oluşan etkiyi bloke eden luzindol ve MT2 reseptörleri ile oluşan etkiyi bloke eden 4P-PDOT ve QR2 enziminin aktivasyonunu sağlayan GR135531 (MT3 reseptör agonisti) 10^{-5} M konsantrasyonda kullanılmıştır. Melatoninin 10^{-1} , 10^{-3} M konsantrasyonlarında sitotoksik etkisi 10^{-6} M nonselektif melatonin reseptör antagonisti luzindol ve MT2 selektif reseptör antagonisti 4P-PDOT ve MT3 reseptör agonisti GR135531 tarafından anlamlı şekilde bloke edilmiş ve kontrol seviyelerine yaklaşmıştır (Şekil 20). 10^{-4} ila 10^{-7} M konsantrasyonda melatonin ise canlılığı kontrol seviyelerinde tutmuş, 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-7} M melatonin ile kombine edilen 10^{-6} M LZL, 4P-PDOT veya GR135531 canlılık üzerine etki etmezken, 10^{-6} M melatonin ile kombine edilen 10^{-6} M LZL, 4P-PDOT veya GR135531 canlılığı anlamlı bir şekilde artırmıştır. Şekil 19'da kullanılan antagonist konsantrasyonları 10^{-5} iken, şekil 20'de kullanılan antagonist konsantrasyonları 10^{-6} 'dır. Bu iki grafik arasındaki fark temel olarak 4P-Pdot, LZL ve GR135531 konsantrasyonlarından kaynaklanmaktadır.

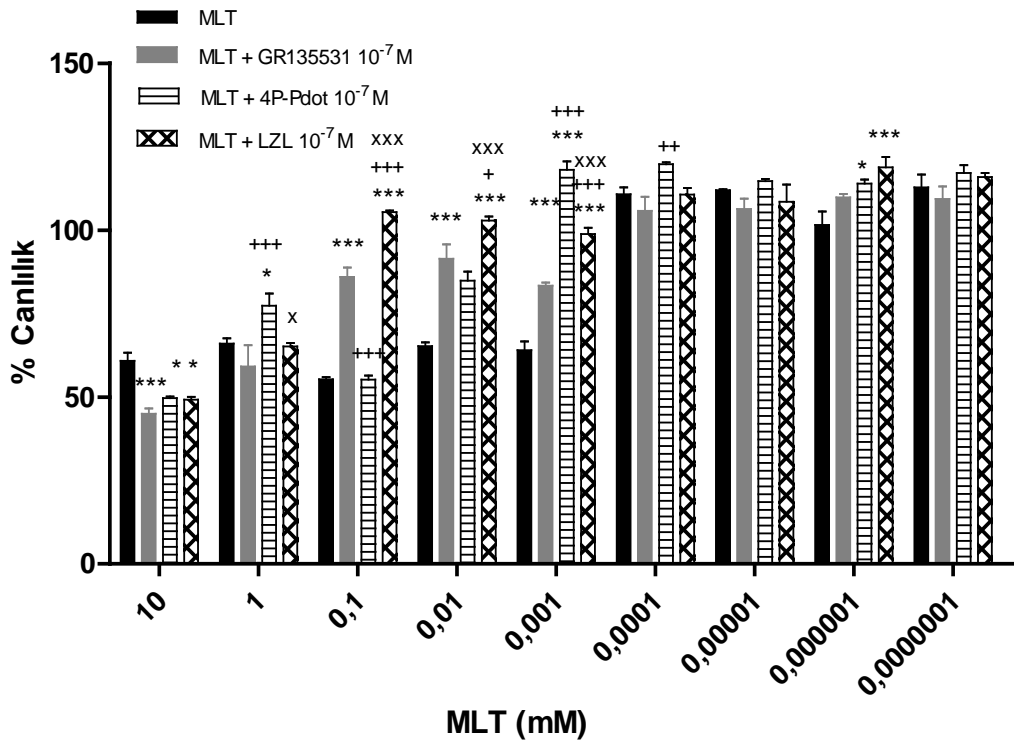


Şekil 21. HUVEC Hücre Dizisine 24 Saatlik Melatonin ve Sırayla Melatoninine Eklenen GR135531 (10^{-6} M), 4P-PDOT (10^{-6} M), Luzindol (10^{-6} M) İnkübasyonu Sonunda Elde Edilen % Canlılık. MLT Grubuna Göre Anlamli Farklılık * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; MLT+GR135531 Grubuna Göre Anlamli Farklılık ⁺ $p < 0,05$; İki Yönlü Varyans Analizinin Ardından Bonferroni Çoklu Karşılaştırma Testi (n:3).

Şelik 21’de görülen grafikten elde edilen anlamlılık değerleri şöyle sıralanabilir: 10M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubunda MLT grubuna göre anlamlı farklılık ** $p < 0,01$; 1M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+GR135531 grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 1M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 1M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık * $p < 0,05$; 0,1M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+GR135531 grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; ; 0,1M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; ; 0,1M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 0,1M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık ⁺ $P < 0,05$; 0,01M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+GR135531 grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 0,01M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 0,01M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 0,001M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+GR135531 grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 0,001M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 0,001M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık *** $P < 0,001$; 0,000001M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+GR135531 grubunda anlamlı farklılık ** $p < 0,01$; 0,000001M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık ** $p < 0,01$; 0,000001M MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık ** $p < 0,01$.

10^{-7} M 4P-Pdot , GR135531 ve LZL ile Gerçekleştirilen MTT testleri

Melatonin ile MT1/MT2 reseptörleri aracılığıyla oluşan etkiyi bloke eden luzindol ve MT2 reseptörleri ile oluşan etkiyi bloke eden 4P-PDOT ve QR2 enziminin aktivasyonunu sağlayan GR135531 (MT3 reseptör agonisti) 10^{-7} M konsantrasyonda kullanılmıştır. 10^{-7} M konsantrasyonda melatoninin sitotoksik etkisi 10^{-7} M luz ve 10^{-7} M 4P-PDOT ile anlamlı şekilde engellenmiştir (Şekil 21). 10^{-1} , 10^{-3} M melatonin konsantrasyonlarında görülen sitotoksik etki ise 10^{-7} M nonselektif melatonin reseptör antagonisti luzindol ve MT2 selektif reseptör antagonisti 4P-PDOT ve MT3 reseptör agonisti GR135531 tarafından anlamlı şekilde bloke edilmiş ve kontrol seviyelerine yaklaşmıştır. 10^{-4} ila 10^{-7} M konsantrasyonda melatonin ise canlılığı kontrol seviyelerinde tutmuş, 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-7} M melatonin ile kombine edilen 10^{-6} M luz, 4P-PDOT veya GR135531 canlılık üzerine etki etmezken, 10^{-6} M melatonin 10^{-6} M LZL veya 4P-PDOT ile kombine edildiğinde canlılıkta anlamlı bir artış görülmektedir.



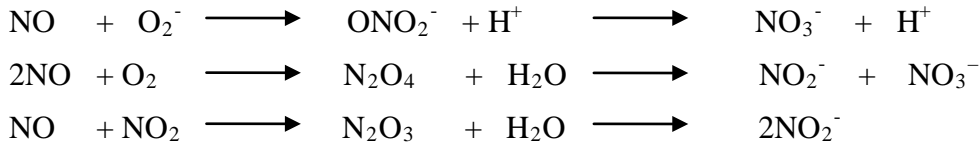
Şekil 22. HUVEC Hücre Dizisine 24 Saatlik Melatonin ve Sırayla Melatonine Eklenen GR135531 (10^{-7} M), 4P-PDOT (10^{-7} M), Luzindol (10^{-7} M) İnkübasyonu Sonunda Elde Edilen % Canlılık. MLT Grubuna Göre Anlamlı Farklılık * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; MLT+GR135531 Grubuna Göre Anlamlı Farklılık + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$; MLT+4P-Pdot Grubuna Göre Anlamlı Farklılık x $p < 0,05$; xxx $p < 0,001$; İki Yönlü Varyans Analizinin Ardından Bonferroni Çoklu Karşılaştırma Testi Yapılmıştır (n:3).

Şekil 22’de görülen grafikte yer alan anlamlılıklar şöyle sıralanabilir: 10M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubunda MLT grubuna göre anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 10M konsantrasyonda MLT+4P-Pdot grubunda MLT grubuna göre anlamlı farklılık * $p < 0,05$; 10M konsantrasyonda MLT+LZL grubunda MLT grubuna göre anlamlı farklılık * $p < 0,05$; 1M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık * $p < 0,05$; 1M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık +++ $p < 0,001$; 1M konsantrasyonda MLT+4P-Pdot grubuna göre MLT+LZL grubunda

anlamli farklilik ^X $p < 0,05$; 0,1M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+GR135531 grubunda anlamli farklilik *** $p < 0,001$; 0,1M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamli farklilik ⁺⁺⁺ $P < 0,001$; 0,1M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamli farklilik *** $p < 0,001$; 0,1M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamli farklilik ⁺⁺⁺ $p < 0,001$; 0,1M konsantrasyonda MLT+4P-Pdot grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamli farklilik ^{xxx} $p < 0,001$; 0,01M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+GR135531 grubunda anlamli farklilik *** $p < 0,001$; 0,01M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamli farklilik *** $p < 0,001$; 0,01M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamli farklilik ⁺ $p < 0,05$; 0,01M konsantrasyonda MLT+4P-Pdot grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamli farklilik ^{xxx} $p < 0,001$; 0,001M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+GR135531 grubunda anlamli farklilik *** $p < 0,001$; 0,001M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamli farklilik ⁺⁺⁺ $p < 0,001$; 0,001M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamli farklilik *** $p < 0,001$; 0,001M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamli farklilik ⁺⁺⁺ $p < 0,001$; 0,001M konsantrasyonda MLT+4P-Pdot grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamli farklilik ^{xxx} $p < 0,001$; 0,0001 M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubunda göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamli farklilik ⁺⁺ $p < 0,01$; 0,000001 M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamli farklilik * $p < 0,05$; 0,000001 M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamli farklilik *** $p < 0,001$

Total Nitrit/Nitrat Miktarı

NO biyolojik sıvılarda birçok molekülle bir seri reaksiyona girer. Bu reaksiyonlar şöyledir:



NO'nin final ürünleri *in vivo* şartlarda nitrit (NO₂⁻) ve nitrat (NO₃⁻) oluşumudur. Nitrit ve nitratın birbirine oranı değişebilmektedir ve bu oran bir kesinlik arz etmez. Bu yüzden total NO üretiminin en iyi göstergesi hem nitrit hem de nitrat oluşumunun toplamıdır (Nims ve ark., 1995). Bu çalışmamızda gerçekleştirilen total nitrit nitrat tayini NO göstergesi olarak yapılmıştır.

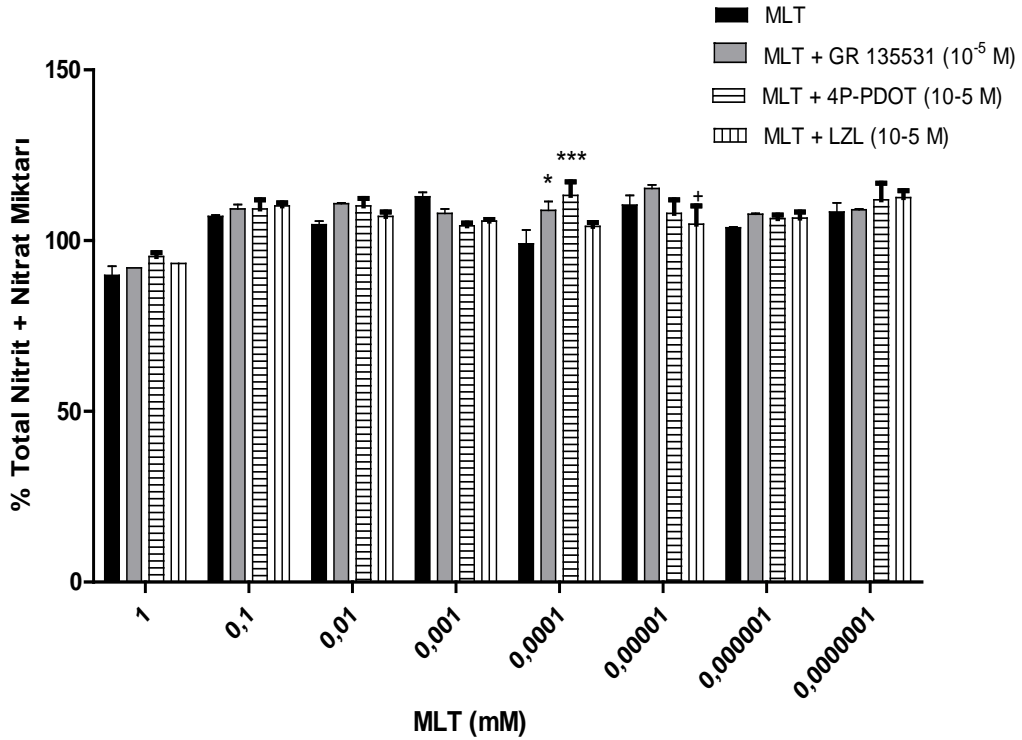
Son zamanlarda yapılan çalışmalarda melatoninin NO üzerindeki etkisi hakkında elde edilen bulgular çeşitlilik göstermektedir.

Bir çalışmada *in vitro* koşullarda bradikinin ile indüklenen NO üretiminin melatonin varlığından etkilenip etkilenmediği araştırılmıştır. Bu çalışmada sıçan mikrovasküler endotel hücreleri, NO veya Ca²⁺ varlığını belirlemek üzere floresan boya ile inkübe edilmiştir. Bradikininin (1–100 nm) sitozolik Ca²⁺ ve NO üretimini artırdığı, melatonin varlığında (1 nm) ise NO üretiminin kaybolduğu fakat sitozolik Ca²⁺ artışına etki etmediği bulunmuştur. N-asetilserotonin (0.1 ve 1 nm) ile aynı etki görülmüş fakat MT₃ selektif agonisti (5-MCA-NAT, 1 nm) ile hiç etki elde edilmemiştir. Nonselektif ve MT₂ selektif antagonistler de melatonin ile oluşan etki değiştirmemiştir. Bu durum, melatoninin bradikinin ile indüklenen NO sentezini azaltma etkisinin MT reseptörleri üzerinden olmadığı sonucunu

doğurmaktadır. Aynı çalışma melatoninin direkt kalmodulin inhibisyonu yapması ihtimali olmadığı yorumu yapılmakta çünkü melatonin sitozolik Ca^{2+} üzerine kalmidazolium'un yaptığı etkiye benzer bir etki yapmadığı gösterilmektedir. Melatonin ayrıca 1M bradikinin ile indüklenen cGMP üretimini de durdurmaktadır, burdan anlaşıldığı kadarıyla NO üretimindeki alt yollar bozulmaktadır. Özet olarak bradikinin ile indüklenen NO üretimi melatonin ile azalmakta ve bu durum NO üretiminde yolağın başlarında Ca^{2+} -kalmodulin ve NOS etkileşmesi sırasında meydana gelebileceği ihtimalini düşündürmektedir (Eduardo ve ark., 2006).

Diğer bir çalışmada aorta halkaları kültür mediumu (DMEM) ile muamele edildiğinde; yaşlanma, oksidatif stres ve inflamasyonda olduğu gibi, nitrik oksit aracılı gevşeme artmakta, vazokonstrüktör ajanlara arterial duyarlılık düşmektedir. Melatoninin bu uygulama sonucu azalan kasılma duyarlılığını değiştirip değiştirmediği test edilmiştir. 10^{-8} M melatonin ve 10^{-5} M melatonin olmak üzere iki konsantrasyon kullanılmıştır. 3 gün kültür medyumunda bekletilen aortaların iNOS ekspresyonları düşmüş, norepinefrin ile kasılma cevapları azalmıştır. Organ banyosuna eklenen (10^{-8} M) melatonin bu cevapları düzeltmese de , 3 gün melatonin (10^{-5} M) ile inkübasyon kasılma yanıtlarını düzeltmiş ve iNOS ekspresyonu artmıştır. Luzindol (2×10^{-6} M) varlığında bu kasılma yanıtları bozulmuştur. Ayrıca melatonin (10^{-5} M) katalaz aktivitesini artırmıştır (Lartaud ve ark., 2007).

10^{-5} M 4P-Pdot , GR135531 ve LZL ile Gerçekleştirilen Total Nitrit/Nitrat Miktarı



Şekil 23. HUVEC Hücre Dizisine 24 Saatlik Melatonin ve Sırayla Melatonine Eklenen GR135531 (10^{-5} M), 4P-PDOT (10^{-5} M), Luzindol (10^{-5} M) İnkübasyonu Sonunda Elde Edilen % Total Nitrit+Nitrat Miktarı. MLT Grubuna Göre Anlamlı Farklılık * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; İki Yönlü Varyans Analizinin Ardından Bonferroni Çoklu Karşılaştırma Testi Yapılmıştır (n:2).

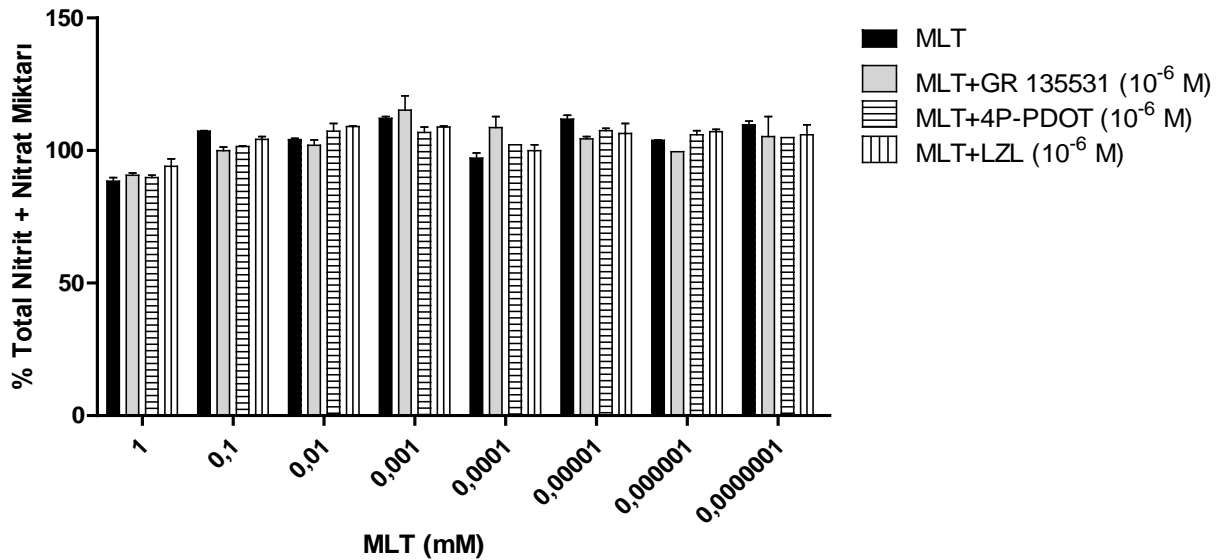
Bu tez çalışmasında Şekil 23’de görülen grafikten elde ettiğimiz sonuçlara göre 10^{-4} mM melatonin ile inkübasyondan sonra total nitrit nitrat miktarı azalmıştır. 10^{-4} mM melatonin ile 10^{-5} M 4P-Pdot kombine olarak inkübe edildiğinde anlamlı olarak total nitrit ve nitrat miktarı yükselmiştir. Bu sonuca göre özellikle MT2 reseptörünün melatoninin NO miktarını baskılayıcı etkisine aracılık ettiği söylenebilir. Bu bulgu kaudal arterde Dubocovich ve ark. (2003) yaptığı çalışma ile çelişmekte iken Tunstall ve ark., (2010) domuz koroner arterinde yaptığı çalışma ile uyumludur.

10^{-4} mM Melatonin ve 10^{-6} M GR135531 birlikte inkübe edildiğinde, 10^{-4} mM melatonin göre anlamlı olarak daha yüksek total nitrit ve nitrat miktarı ölçülmüştür. MT3 reseptör agonisti GR135531 ile görülen bu etki daha çok antioksidan mekanizma ile ilgilidir.

Ayrıca şekil 23’de görüldüğü gibi luzindol ile total nitrit nitrat miktarı daha da azalmaktadır. Dolayısıyla MT1 reseptörünün total nitrit nitrat miktarının artmasında rolü olabilir, yine de bu bulgu daha detaylı ölçümlerle desteklenmelidir.

0,0001 mM konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+GR135531 grubunda anlamlı farklılık * $p < 0,05$, 0,0001 mM konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-PDOT grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$, 0,00001 mM konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık + $p < 0,05$.

10^{-6} M 4P-Pdot , GR135531 ve LZL ile Gerçekleştirilen Total Nitrit/Nitrat Miktarı



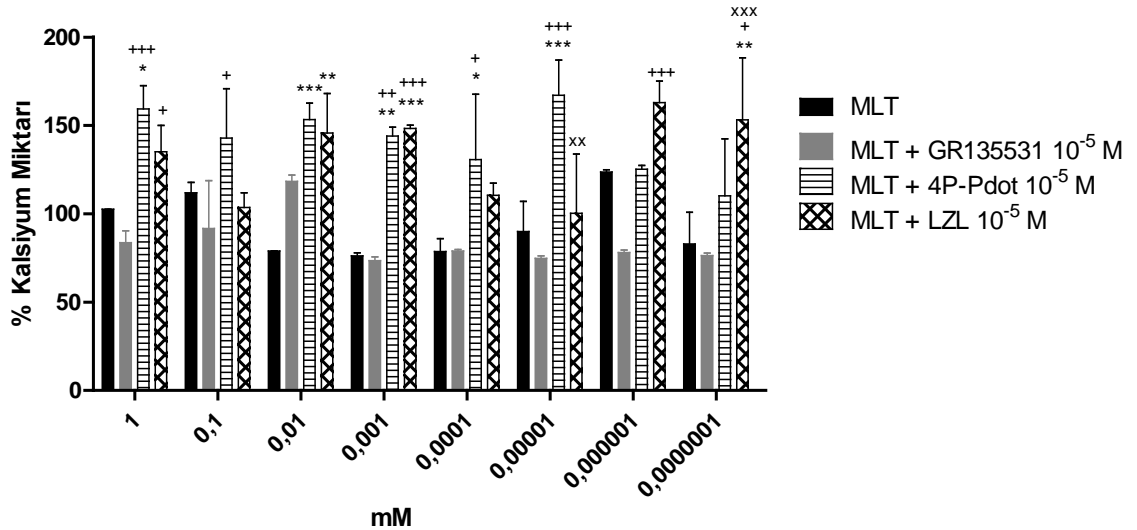
Şekil 24. HUVEC Hücre Dizisi ile Melatonin ve Sırayla Melatonin ile kombine edilen GR135531 (10^{-6} M), 4P-PDOT (10^{-6} M), Luzindol (10^{-6} M) ile 24 Saatlik İnkübasyonu Sonunda Elde Edilen % Total Nitrit+Nitrat Miktarı. İki Yönlü Varyans Analizinin Ardından Bonferroni Çoklu Karşılaştırma Testi Yapılmıştır (n:2).

Şekil 24’den elde edilen anlamlı fark elde edilememiştir.

Kalsiyum Miktar Tayini

Siçan aortası üzerinde yapılan deneylerde elde edilen sonuçlardan 10^{-5} M melatoninin adrenerjik stimülasyonu artırdığını, 10^{-5} M luzindol ile bu etkinin geri çevrildiği görülmüştür. Vasküler kontraktilete artışın temel olarak endotelten kaynaklandığı görülmüştür. Melatoninin endotelde kalsiyum miktarında meydana getirdiği değişiklikleri bulabilmek amacıyla Ca^{2+} miktar tayini yapılmıştır. Tamura ve ark. (2006) yaptığı ve *cremaster* (testislere bağlı ince kas) kasından izole ettiği mikrovasküler endotel hücrelerinde melatonin ve bradikinin kombinasyonunun etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada endotel hücresinde bradikininin (1-100 nM) NO ve kalsiyum miktarını artırdığı ve melatonin (1 nM) ile bu değişimlerden yalnız NO miktarındaki artışın azaldığı fakat sitozolik kalsiyum artışında bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Selektif MT3 reseptör agonisti 5-MCA-NAT (1 nM) ile ise hiçbir değişiklik gözlenmemiştir (Tamura ve ark., 2006). Bizim bulgularımız ise Tamura ve ark. (2006) yaptığı çalışma ile NO miktarı bakımından uyumlu iken, kalsiyum miktarı bakımından çelişmektedir. 10 ila 10^{-7} M melatonin HUVEC hücresinde kendi başına verildiğinde hücre içi Ca^{2+} miktarını, 10^{-5} veya 10^{-6} M luzindol yada 4P-Pdot ile kombine edildiğinde elde edilen Ca^{2+} miktarına kıyasla artırdığını göstermektedir, fakat GR135531 ile melatonin kombinasyonunun kalsiyum miktarını melatonine kıyasla etkilemediği görülmektedir. Bu tez çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre melatonin HUVEC hücrelerinde hücre içine kalsiyum girişini melatonin reseptörleri aracılığıyla artırmaktadır, ancak hangi reseptör alt tipinin daha çok bu etkide rol oynadığını söylemek mümkün değildir.

10^{-5} M 4P-Pdot , GR135531 ve LZL ile Gerçekleştirilen % Kalsiyum Miktarı

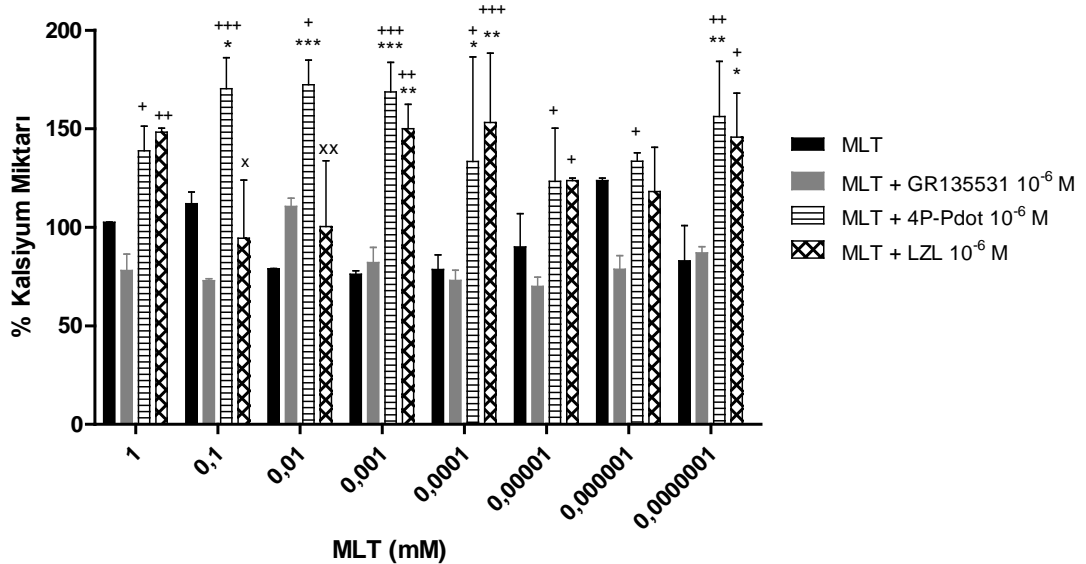


Şekil 25. HUVEC Hücre Dizisine Artan Konsantrasyonda Uygulanan Melatonin ($1-10^{-7}$ Mm) ve Melatonin ile Kombine Edilen GR135531 (10^{-5} M), 4P-PDOT (10^{-5} M), Ve Luzindol (10^{-5} M) ile 24 Saatlik İnkübasyonun Ardından Medyumda Bulunan % Kalsiyum Miktarı. MLT Grubuna Göre Anlamlı Farklılık *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; MLT+GR135531 Grubuna Göre Anlamlı Farklılık +++ $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$; + $p < 0,05$; MLT+4P-Pdot Grubuna Göre Anlamlı Farklılık xxx $p < 0,001$; xx $p < 0,01$; x $p < 0,05$;

Şekil 25’de yer alan grafikte görülen anlamlılıklar şöyle sıralanabilir: 1mM konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık * $p < 0,05$; 1mM konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+4P-Pdot

grubunda anlamlı farklılık +++ $p < 0,001$; 1M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık + $p < 0,05$; 0,1M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık + $p < 0,05$; 0,01mM konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık *** $P < 0,001$; 0,01mM konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık ** $p < 0,01$; 0,001M konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık ** $p < 0,01$; 0,001M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık ++ $p < 0,01$; 0,001mM konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 0,001mM konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık +++ $p < 0,001$; 0,0001 mM konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık * $p < 0,05$; 0,0001 M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık + $p < 0,05$; 0,00001 mM konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık *** $p < 0,001$; 0,00001 M konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+4P-Pdot grubunda anlamlı farklılık +++ $p < 0,001$; 0,00001 mM konsantrasyonda MLT+4P-Pdot grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık xx $p < 0,01$; 0,000001 mM konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık +++ $p < 0,001$; 0,0000001 mM konsantrasyonda MLT grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık ** $p < 0,01$; 0,0000001 mM konsantrasyonda MLT+GR135531 grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık + $p < 0,01$; 0,0000001 mM konsantrasyonda MLT+4P-Pdot grubuna göre MLT+LZL grubunda anlamlı farklılık xxx $p < 0,001$. İki yönlü varyans analizinin ardından bonferroni çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır.

10^{-6} M 4P-Pdot , GR135531 ve LZL ile Gerçekleştirilen % Kalsiyum Miktarı



Şekil 26. HUVEC Hücre Dizisine Artan Konsantrasyonda Uygulanan Melatonin ($1 \cdot 10^{-7}$ M) ve Melatonin ile Kombine Edilen GR (10^{-6} M), 4P-PDOT (10^{-6} M), ve Luzindol (10^{-6} M) İle 24 Saatlik İnkübasyonun Ardından Belirlenen % Hücre Dışındaki Kalsiyum Miktarı. MLT Grubuna Göre Anlamlı Farklılık *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; MLT+GR135531 Grubuna Göre Anlamlı Farklılık +++ $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$; + $p < 0,05$; MLT+4P-Pdot Grubuna Göre Anlamlı Farklılık xxx $p < 0,001$; xx $p < 0,01$; x $p < 0,05$;

Şekil 26’de görülen grafikte yer alan anlamlılıklar şöyle sıralanabilir: 1M konsantrasyonda Mel+GR grubuna göre Mel+Pdot grubunda anlamlı farklılık ⁺ $P<0,05$; 1M konsantrasyonda Mel+GR grubuna göre Mel+Luz grubunda anlamlı farklılık ⁺⁺ $P<0,01$; 0,1M konsantrasyonda Mel grubuna göre Mel+Pdot grubunda anlamlı farklılık * $P<0,05$; 0,1M konsantrasyonda Mel grubuna göre Mel+Pdot grubunda anlamlı farklılık ⁺⁺⁺ $P<0,001$; 0,01M konsantrasyonda Mel grubuna göre Mel+Pdot grubunda anlamlı farklılık ^{***} $P<0,001$; 0,01M konsantrasyonda Mel+GR grubuna göre Mel+Pdot grubunda anlamlı farklılık ⁺ $P<0,001$; 0,01M konsantrasyonda Mel+Pdot grubuna göre Mel+Luz grubunda anlamlı farklılık ^{XX} $P<0,01$; 0,001M konsantrasyonda Mel grubuna göre Mel+Pdot grubunda anlamlı farklılık ^{***} $P<0,001$; 0,001M konsantrasyonda Mel+GR grubuna göre Mel+Pdot grubunda anlamlı farklılık ⁺⁺⁺ $P<0,001$; 0,001M konsantrasyonda Mel grubuna göre Mel+Luz grubunda anlamlı farklılık ^{**} $P<0,01$; 0,001M konsantrasyonda Mel+GR grubuna göre Mel+Luz grubunda anlamlı farklılık ⁺⁺ $P<0,01$; 0,0001 M konsantrasyonda Mel grubuna göre Mel+Pdot grubunda anlamlı farklılık * $P<0,05$; 0,0001 M konsantrasyonda Mel+Gr grubuna göre Mel+Pdot grubunda anlamlı farklılık ⁺ $P<0,05$; 0,0001 M konsantrasyonda Mel grubuna göre Mel+Luz grubunda anlamlı farklılık ^{**} $P<0,01$; 0,0001 M konsantrasyonda Mel+GR grubuna göre Mel+Luz grubunda anlamlı farklılık ⁺⁺⁺ $P<0,001$; 0,00001 M konsantrasyonda Mel grubuna göre Mel+Pdot grubunda anlamlı farklılık * $P<0,05$; 0,00001 M konsantrasyonda Mel+GR grubuna göre Mel+Pdot grubunda anlamlı farklılık ⁺ $P<0,05$; 0,00001 M konsantrasyonda Mel+GR grubuna göre Mel+Luz grubunda anlamlı farklılık ⁺ $P<0,05$; 0,000001 M konsantrasyonda Mel+GR grubuna göre Mel+Pdot grubunda anlamlı farklılık ⁺ $P<0,05$; 0,0000001 M konsantrasyonda Mel grubuna göre Mel+Pdot grubunda anlamlı farklılık ^{**} $P<0,01$; 0,0000001 M konsantrasyonda Mel+GR grubuna göre Mel+Pdot grubunda anlamlı farklılık ⁺⁺ $P<0,01$; 0,0000001 M konsantrasyonda Mel grubuna göre Mel+Luz grubunda anlamlı farklılık * $P<0,05$; 0,0000001 M konsantrasyonda Mel+GR grubuna göre Mel+Luz grubunda anlamlı farklılık ⁺ $P<0,05$. İki Yönlü Varyans Analizinin Ardından Bonferroni Çoklu Karşılaştırma Testi Yapılmıştır.

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Melatonine ait vasküler etkilerin değerlendirildiği çalışmalar incelendiğinde makaleler arasında bir fikir birliği bulunmadığı görülmektedir. Melatoninin sentetik törevi olan ramelteonun sistemik olarak verilmesinden sonra hipotansif etki gösterdiğini bulan çalışmalar olduğu kadar (Oxenkrug ve Summergrad, 2010), melatoninin sağlıklı insanlarda ön kol kan basıncını artırdığını gösteren çalışmalar da (Cook ve ark., 2010) bulunmaktadır. Melatoninin sıçan kaudal arterinde MT1 reseptörü aracılığıyla vazokonstriktör, MT2 reseptörü aracılığıyla vazodilatör etki gösterdiğini bulan ve alt mekanizmasını aydınlatan çalışmalar bulunduğu gibi (Dubocovich ve ark., 2003), sıçan aortasında (aracılık eden reseptör alt tipi tayin edilememiş olsa da) gevşetici etkisi olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Satake ve ark., 1986).

Melatoninin vasküler etkisi hakkında yazılan makaleler kronolojik değerlendirildiğinde, eskiden yapılan çalışmalarda melatoninden vazorelaksan etki beklentisinin yüksek olduğu ve çalışmaların gevşeme yanıtları üzerinde yoğunlaştığı ve bulguların kısmen bu yönde olduğu (melatoninin metoksamin ile görülen vazokonstriktör etkinin efikasitesini azalttığını) görülmektedir (Weekley, 1991). Zaman içinde melatoninden beklenen hipertansiyon dahil ‘her derde deva’

etki, daha rasyonel ve gerçekçi bir çizgiye oturmaya başlamış ve melatoninin sıçan aortasında adrenerjik stimülasyonla oluşan vazokonstriksiyon üzerine etkili olmadığı fakat KCl ile oluşan kasılmayı azalttığı gösterilmiştir (Monroe ve Watts, 1998). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise endotelsiz sıçan aortasının melatoninin KCl ile oluşan kasılmayı değiştirmedeği ve Phe ile oluşan kasılmayı özellikle deneysel *aging* durumunda artırdığı gösterilmiştir (Lartaud ve ark., 2007). Melatoninin sıçan kaudal arterinde MT1 reseptörleri aracılığıyla adrenerjik stimülasyonla oluşan kan basıncını artırmakta ve MT2 reseptörü aracılığıyla gevşemeye yol açmaktadır (Dubocovich ve ark., 2010). Domuz koroner arterinde ise MT2 reseptörü melatonin ile görülen NO baskılayıcı etkiye aracılık etmektedir (Tunstall ve ark., 2010). Sıçan aortasında yapılan çalışmalar ise belli bir sonuca ulaşmak için çelişkili ve yetersiz kalmaktadır. Sıçan aortasında melatoninin etkilerini değerlendiren ayrıntılı çalışmaların yapılmamasının en büyük sebebi radyoaktif 2-iyodomelatoninin bağlanma bölgelerinin (melatonin reseptörlerinin) sıçan vasküler sisteminde yalnız kaudal arter ve serebral arterlerle sınırlı olduğunun gösterilmesidir (Viswanathan ve ark., 1990). Fakat iyot büyük bir molekül olduğu için bu ölçüm yönteminin yeterince duyarlı olup olmadığı düşünülmelidir. Nitekim son zamanlarda yapılan bir çalışmada sıçan aortasında MT1 reseptörünün varlığı ispatlanmıştır (Schepelmann ve ark., 2011). Aynı çalışmada sıçan aortasında MT2 reseptörünün bulunmadığı ve MT1 reseptörlerinin de özellikle endotelde yoğunlaştığı gösterilmektedir. Melatonin ile yapılan vasküler çalışmalar incelendiğinde endotel tabakanın melatoninin etkisinde önemli olduğu sonucuna ulaşılabilir çünkü melatonin NO üzerinde baskılayıcı bir etkisi bulunmaktadır (Tamura ve ark., 2006; Silva ve ark., 2007; Tunstall ve ark., 2010).

Sıçan aortası çalışmalarında luzindol için 10^{-5} M konsantrasyon seçilmiştir çünkü MT1 reseptörünün LZL ile tamamen bloke edilebilmesi için en az bu konsantrasyonda kullanılması gerekmektedir (Dubocovich ve ark., 2003).

Ohe ile ön kasılma sağlandıktan sonra artan konsantrasyonda MLT verilerek cevap eğrisi elde edilmiş fakat melatonin phe cevabında bir fark ortaya çıkarmamıştır (Data verilmemiştir).

Grafiklerimizden çıkardığımız istatistiksel sonuçlara göre endotelli aortada melatoninin ön inkübasyonu phe konsantrasyon-yanıt eğrisinin maksimum yanıtında belirgin bir artış ortaya çıkarmış ve bu etkisi LZL inkübasyonu ile kontrol değerlerinin de altına düşmüştür (Şekil 15). Melatonin phe konsantrasyon-yanıt eğrisini sola kaydırmış, LZL inkübasyonu ise belirgin bir sağa kayma indüklemiştir (Çizelge 6). Gevşeme yanıtları üzerinde melatoninin etkisi değerlendirilirken (melatoninin phe cevabını artırıcı etkisini bertaraf etmek için) phe ön kasılmasından sonra inkübasyonlar gerçekleştirilmiştir. Ach yanıtları bakımından endotelli ve endotelsiz grupta fark gözlenmemiştir (Şekil 16, çizelge 7). Phe ile ön kasılma sağlandıktan sonra SNP konsantrasyon-yanıt eğrilerinde melatonin inkübasyonu ile sola kayma göze çarpmaktadır. Ek olarak LZL SNP konsantrasyon yanıt eğrisini belirgin olarak sağa kaydırmıştır (Çizelge 17, şekil 8). Endotelsiz aortada ise Ach yanıtları açısından gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir (Şekil 18, Çizelge 9). Yine endotelsiz aortada SNP konsantrasyon yanıt eğrilerinde melatonin inkübasyonu gevşeme yanıtlarını artırmış ancak bu etki LZL ile geri çevrilememiştir. Buna karşılık hem melatonin hem luzindol SNP konsantrasyon-yanıt eğrisini belirgin olarak sola kaydırmıştır (Şekil 19, Çizelge 10).

Bu sonuçlara dayanarak elde edilen sonuçlar şöyle sıralanabilir: melatonin endotelli sıçan aortasında Phe ve KCl ile elde edilen kasılma yanıtlarını MT1 reseptörü aracılığıyla artırmaktadır. Sıçan aortasında mRNA ve protein düzeyinde yalnız MT1 reseptörü bulunması ve gözlenen bu artışın, luzindol ile inkübasyondan sonra ortadan kalkmasına bağlı olarak melatoninin MT1 reseptörü aracılığıyla endotelli sıçan torakal aortasında adrenerjik stimülasyonla oluşan vazokonstriktör etkiyi artırdığı söylenebilir. Endotelli ve endotelsiz aortada Ach ile elde edilen gevşeme yanıtları kontrol ile kıyaslandığında anlamlı fark elde edilmemiştir. Asetilkolin ile elde edilen gevşemenin temel olarak NO üzerinden gerçekleştiği düşünülecek olursa melatoninin NO üzerinde MT1 reseptörü üzerinden bir etki oluşturmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Melatoninin hem endotelli hem de endotelsiz aortada SNP ile elde edilen gevşemeyi artırıcı etkisi ve bu etkilerin yalnızca endotelli damarda luzindol ile kısmen geri çevrilebilmesi melatoninin ortama verilen nitrik oksitini kısmi toksik etkisini daha çok antioksidan mekanizmalara ve melatonin ile oluşan QR2 enziminin aktivasyonuna bağlı olarak artırdığını düşündürmüştür. Yine de bu bulgunun ortaya çıkmasında rol oynayan etkenler ve mekanizmalar hakkında kesin bir sonuca ulaşabilmek için daha detaylı araştırmaların yapılması gerekmektedir. Sıçan aortasında yapısal olarak MT2 reseptörlerini bulunmaması ve selektif bir MT1 reseptör antagonistinin de bulunmaması sebebiyle, sıçan aortası melatonin ile MT1 reseptörü aracılığıyla meydana gelen vasküler etkilerinin daha detaylı incelemesi açısından çok elverişli bir modeldir.

Ayrıca melatoninin etkisinin ortaya çıkmasında belirleyici rol oynadığını düşündüğümüz endotel hücresi (HUVEC) üzerinde de araştırmalar gerçekleştirdik. Sitotoksik ve proliferatif konsantrasyonların belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda inkübasyonlar yapılarak MTT testleri uygulanmıştır (Şekil 20, 21, 22). *In vitro* koşullarda NO üretiminin melatonin varlığından etkilenip etkilenmediği araştırılmıştır. Grafiklere genel olarak bakıldığında melatoninin NO üzerinde etkisiz olduğu düşünülebilir (Şekil 23, 24). Melatonin hücre içine kalsiyum girişini artırmaktadır fakat reseptör alt tipini ayırmak için selektif MT1 reseptör antagonistinin varlığına gereksinim duyulmaktadır. HUVEC ile yaptığımız çalışmalar aorta ile bulduğumuz sonuçları destekler niteliktedir. Elde edilen sonuçlara göre melatonin HUVEC hücrelerinde temel olarak hücre içi kalsiyum miktarını artırıcı rol oynamaktadır ve bu etkinin ortaya çıkmasında daha çok MT1 olmak üzere her iki reseptörün de rol oynadığı gözlenmektedir. Melatoninin HUVEC hücrelerinde NO miktarını yalnız 10^{-4} M konsantrasyonlarda ve MT2 reseptörü aracılığıyla azaltmıştır. Melatoninin MT2 reseptörü üzerinde sıçan torakal aortasında NO baskınlanmasında etkin olduğunu düşündürmektedir.

Damar yataklarında birbirine zıt çalışan aynı gruptan reseptör bulunması sık karşılaşılan bir durumdur. Öncelikle insan damar yataklarının melatonin reseptörü bulundurma durumu bakımından farklılık gösterip göstermediği değerlendirilmelidir çünkü örneğin sıçanda kaudal arterde MT1 ve MT2 reseptörü bulunuyorken, aortada yalnız MT1 reseptörünün var olduğu gösterilmiştir (Viswanathan ve ark., 1992; Schepelmann ve ark., 2010). Ayrıca melatonin reseptörüne ait alt tiplerin bulunabileceği ihtimali unutulmamalıdır. Melatonin kendi endojen olarak kısa etkili bir madde olduğu için terapötik olarak kullanılmaya uygun değildir ancak reseptörleri hakkında yapılacak detaylı araştırmalar ve uygun, uzun ömürlü, selektif ve potent antagonistlerin

keşfedilmesi hipertansiyon gibi vasküler hastalıkların tedavisinde yeni bir çığır açabilir. Ayrıca sıçan aortasında melatoninin farklı mekanizmalarla vazokonstriktör etki oluşturan (anjitensin, endotelin gibi) agonistlerin yanıtları üzerine etkileri luzindol varlığında değerlendirilebilir.

KAYNAKÇA

- [http-1:Melatoninin kimyasal yapısı,](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Melatonin.png)
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Melatonin.png> (03.07.2013).
- [http-2: Vatikanda bulunan çam kozalağı heykeli,](http://en.wikipedia.org/wiki/Cortile_del_Belvedere)
http://en.wikipedia.org/wiki/Cortile_del_Belvedere (07.07.2013).
- [http 3: Kinon redüktaz 2 enziminin adlandırılması,](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/6/5/2.html)
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/6/5/2.html> (07.07.2013).
- Akmali, M., Ahmadi, R., Vessal, M., Pre- and Post-Treatment of Streptozocin Administered Rats with Melatonin: Effects on Some Hepatic Enzymes of Carbohydrate Metabolism, *Archives of Iranian Medicine*, 13, 2 (2010).
- Baydaş, G., Canatan, H., Türkoğlu, A., Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus, *Journal of Pineal Research*, 32 (4), 225-230 (2002).
- Baydaş, G., Reiter, R.J., Yaşar, A., Tuzcu, M., Akdemir, I., Nedzveyskii, V.S., Melatonin reduces glial activity in the hippocampus, cortex and cerebellum of streptozotocin induced diabetic rats, *Free Radic Biol Med.*, 35 (7), 797-804 (2003a).
- Baydaş, G., Reiter, R.J., Nedzvetskii, V.S., Yaşar, A., Tuzcu, M., Ozveren, F., Canatan, H., Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis., *Toxicol Lett.* 3;137(3):169-74 (2003b).
- Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L., Goodman and Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics, eleventh edition, The Mc Graw-Hill Companies, United States of America, 254-168-169 (2006).
- Capsoni, S., Viswanathan, M., De Oliveira, A.M., Saavedra, J.M., Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of Willis, *Endocrinology*, 135 (1), 373-378 (1994).
- Carlberg, C., Gene Regulation by Melatonin, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 917, Iss. 1, (2006).
- Cathy, D., Mahle, G.D., Goggins, P.A., Ryan E., Watson, A.J., Melatonin modulates vascular smooth muscle tone, *J. Biol. Rhythms*, 12 (6), 690-696 (1997).
- Cavallo, A., Daniels, S.R., Dolan, L.M., Bean, J.A., Khoury, J.C., Blood pressure-lowering effect of melatonin in type 1 diabetes. *Journal of Pineal Research*, 36 (4), 262-266 (2004a).
- Cavallo, A., Daniels, S.R., Dolan, L.M., Khoury, J.C., Bean, JA., Blood pressure response to melatonin in type 1 diabetes, *Pediatric Diabetes*, 5, 26-31 (2004b).

- Cook, J.S., Sauder, C.L., Ray C.A., Melatonin differentially affects vascular blood flow in humans, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 300(2): H670–H674 (2011).
- Crooke, A., Huete-Toral, F., Martínez-Águila, A., Martín-Gil, A., Pintor, J., Melatonin and its analogue 5-MCA-NAT potentiate adrenergic receptor-mediated ocular hypotensive effects in rabbits: Significance for combination therapy in glaucoma, *JPET.112.202036* (2013).
- Cui, P., Yu, M., Luo, Z., Dai, M., Han, J., Xiu, R., Yang, Z., Intracellular signaling pathways involved in cell growth inhibition of human umbilical vein endothelial cells by melatonin, *J Pineal Res.* 44(1):107-14 (2008).
- Çınar, M., Serbest, U., Ceyhan, A., Melatonin biyosentezi ve süt keçisi yetiştiriciliğinde eksojen kullanımının üreme performansı ile süt kalitesi üzerine etkisi, *Tübav bilim dergisi*, 4,2 92-96 (2011)
- Doolen, S., Krause, D.H., Duvocovich, M.L., Duckles, S.P., Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle, *European Journal of Pharmacology*, 345, 67-69 (1998).
- Drew, J.E., Williams, L.M., Hannah, L.T., Barrett, P., Abramovich D.R., Melatonin receptors in the human fetal kidney: 2-(125I) iodomelatonin binding sites correlated with expression of Mel1a and Mel1b receptor genes, *Journal of Endocrinology*, 156, 261-267 (1998).
- Dubocovich, M.L., Delagrang, P., Krause, D.N., Sugden, D., Cardinali, D.P., Olcese J., International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors, *Pharmacol Rev*, 62:343–380 (2010).
- Dubocovich, M.L., Rivera-Bermudez, M.A., Gerdin, M.J., Masana, M.I., , Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors, *Frontiers in Bioscience*, d1093-1108 (2003).
- Espino, J., Pariente, J.A., Rodriguez, A.B., Role of melatonin on diabetes-related metabolik disorders, *World J. Diabetes*, 2(6), 82-91 (2011).
- Evans, B.K., Mason, R., Wilson, V.G., Evidence for direct vasoconstrictor activity of melatonin in "pressurized" segments of isolated caudal artery from juvenile rats. *Arch. Pharmac.* 346, 362 365 (1992).
- Girouard, H., Chulak, C., Lejossec, M.; Lamontagne, Di; De Champlain, J., Vasorelaxant effects of the chronic treatment with melatonin on mesenteric artery and aorta of spontaneously hypertensive rat endothelium, *Journal of Hypertension*, 19,8, 1369-1377 (2001).
- Görgün, F.M., Öztürk, Z., Gümüştaş, M.K., Kökoğlu, E., Melatonin administration affects plasma total sialic acid and lipid peroxidation levels in streptozotocin induced diabetic rats, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 65(A), 695–700 (2002).
- Ha, E., Yim, S.V., Chung, J.H., Yoon, K.S., Kang, I., Cho, Y.H. ve Baik, H.H., Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells, *J. Pineal Res.*, 41, 67–72 (2006).

Hickman, A.B., Klein D.C., Dyda F., Melatonin Biosynthesis: The Structure of Serotonin N-Acetyltransferase at 2.5 Å Resolution Suggests a Catalytic Mechanism, *Molecular Cell*, 3, 23–32 (1999).

Hoshida, M.N.S., ve Kario, K., Sleep Duration as a Risk Factor for Cardiovascular Disease- a Review of the Recent Literature, *Current Cardiology Reviews*, 6, 54-61 (2010).

Jones, C., Helfer, G., Brandstätter, R., Melatonin receptor expression in the zebra finch brain and peripheral tissues, *Chronobiol Int.*, 29(2), 189-202 (2012).

Korkmaz, A., Topal, T., Oter, S., Tan, D.X. ve Reiter, R.J., Hyperglycemia-Related Pathophysiologic Mechanisms and Potential Beneficial Actions of Melatonin, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8, 1144-1153 (2008).

Kostoglou-Athanassiou I., Therapeutic applications of melatonin, *Ther Adv Endocrinol Metab*, 4(1) 13–24 (2013).

Krause, D.N., Barrios, V.E., Duckies, S.P., Melatonin receptors mediate potentiation of contractile responses to adrenergic nerve stimulation in rat caudal artery. *Eur. J. Pharmac.* 276, 207-213 (1995).

Krause, D.N. ve Dubocovich, M.L., Melatonin receptors. *Annu. Rev. Pharmac. Toxicol.* 31,549-568 (1991).

Kunz, D., Schmitz, S., Mahlberg, R., Mohr, A., Stöter, C., Wolf, K.J., Herrmann, W.M., A New Concept for Melatonin Deficit: On Pineal Calcification and Melatonin Excretion, *Neuropsychopharmacology*, 21 (6) 765-772 (1999).

Kuş I., Sarsılmaz, M., Pineal Bezin Morfolojik Yapısı ve Fonksiyonları, *T Klin J Med Sci*, 22:221-226 (2002).

Lartaud, I., Faure, S., Tabellion, A., Resende, A.C., Nadaud, S., Bagrel, D., Capdeville-Atkinson, C., Atkinson, J., Melatonin counteracts the loss of agonist-evoked contraction of aortic rings induced by incubation, *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 21, 273–279 (2007).

Lerner, A.B., Case, J.D., Mori, W., Wright, M.R., Melatonin in peripheral nerve, *Nature* 183, 1821 (1959).

Lerner, A.B., Hormonal control of pigmentation, *Annu. Rev. Med.* 11, 187–194 (1960).

Lotufo, C.M.C., Yamashita, C.E., Farsky, S.H.P., Markus, R.P., Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4, *European Journal of Pharmacology* 534, 258–263 (2006).

Lew M.J., Flanders S., Mechanisms of melatonin-induced vasoconstriction in the rat tail artery: a paradigm of weak vasoconstriction, *British Journal of Pharmacology*, 126, 1408-1418 (1999).

Mahle, C.D., Goggins, G.D., Agarwal, P., Ryan, E., Watson, A.J., Melatonin modulates vascular smooth muscle tone, *J Biol Rhythms*. 12, 6:690-6 (1997).

Masana, M.I., Doolen, S., Ersahin, Ç., Al-ghoul, W.M., Duckles, S.P., Dubocovich, M., Krause, D.N., MT2 Melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery, *JPET*, 302,3:1295–1302 (2002).

- McCord C. P. ve Allen F. P., Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation, *JExp Zool*, 23, 207-224 (1917).
- Mitchell, H.A., Weinshenker, D., Good night and good luck: Norepinephrine in sleep pharmacology, *Biochemical Pharmacology*, 79, 801–809 (2010).
- Moncada, S., The L-arginine: nitric oxide pathway, *Acta Physiol. Scand.*, 145, 201-227 (1992).
- Monroe, K.K. ve Watts S.W., The vascular reactivity of melatonin, *Gen. Pharmac.*, 30 (1), 31-35 (1998).
- Nagorny, C.L., Sathanoori R., Voss U., Mulder H., Wierup N., Distribution of melatonin receptors in murine pancreatic islets. *Journal of Pineal Research*, 50(4), 412-417 (2011).
- Nathan, C., Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal* 6, 3051-3064 (1992).
- Nims, R.W., Darbyshire, J.F., Saadevedra, J.E., , Christodoulou, D., Hanbauer, I., Cox, G.W., Grisham, M.B., Laval, F., Cook, J.A., Krishna, M.C., Wink, D.A., Colorimetric methods for the determination of nitric oxide concentration in neutral aqueous solutions. *Methods* 7, 48-54 (1995).
- Nosjean, O., Ferro, M., Coge F., Beauverger, P., Henlin, J.M., Lefouloni F., Fauchere, J.L., Delagrang, P., Canet E., Boutin J., Identification of the melatonin-binding Site MT3 as the Quinone Reductase 2, *J. Biol. Chem.*, 275:31311-31317 (2000).
- Omar, S.H., Saba, N., Melatonin, Receptors, Mechanism, and Uses, *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1(2) (2010).
- Ortiz, G.G., Benítez-King, G.A., Rosales-Corral, S.A., Pacheco-Moisés, F.P., Velázquez-Brizuela, I.E., Cellular and Biochemical Actions of Melatonin which Protect Against Free Radicals: Role in Neurodegenerative Disorders, *Current Neuropharmacology*, 6, 203-214 (2008).
- Oxenkrug, G.F. ve Summergrad, P., Ramelteon attenuates age-associated hypertension and weight gain in spontaneously hypertensive rats, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1199, 114–120 (2010).
- Pandi-Perumala, S.R., Trakhta, I., Srinivasan, V., Spence, D.W., Maestroni, G.J.M., Zisapel, N., Cardinali, D.P., Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways, *Progress in Neurobiology*, 85,(3), 335–353 (2008).
- Paskaloğlu, K., Şener, G., Ayanoğlu-Dülger, G., Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in rat aorta and corpus cavernosum, *European Journal of Pharmacology*, 499 (3), 345-354 (2004).
- Peschke, E., Hofmann, K., Bähr, I., Streck, S., Albrecht, E., Wedekind, D., Mühlbauer, E., The insulin–melatonin antagonism: studies in the LEW.1AR1-iddm rat (an animal model of human type 1 diabetes mellitus) *Diabetologia*, 54:1831–1840 (2011).
- Peschke, E., Melatonin, endocrine pancreas and diabetes, *J. Pineal Research*, 44, 26-40 (2008).

Peschke, E., Mühlbauer, E., New evidence for a role of melatonin in glucose regulation, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 24, 829–841 (2010).

Peschke, E., Stumpf, I., Bazwinsky, I., Litvak, L., Dralle, H., Mühlbauer, E., Melatonin and type 2 diabetes – a possible link?, *J. Pineal Res.*, 42, 350–358 (2007).

Peschke, E., Wolgast, S., Bazwinsky, I., Ponicke, K., Mühlbauer, E., Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes, *J. Pineal Res.*, 45,439–448 (2008).

Requintina, P.J., ve Oxenkrug, G.F., Effect of luzindole and other melatonin receptor Antagonists on iron- and lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1122, 289–294 (2007).

Reiter, R.J., Melatonin in the context of the reported bioeffects of environmental electromagnetic fields, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 47, 135–142 (1998).

Reiter R.J., *The Pineal Gland*, CRC Press, Florida, Vol 1, 3-15 (1981).

Reiter R.J., *The Pineal Research Reviews*, Alan R. Liss, Inc., 41 East 11th Street, New York, Vol 3, 44-45 (1985).

Reyes-Toso, C.F., Linares, L.M., Albornoz, L.E., Obaya-Naredo, D., Wallinger, M.L., Ricci, C.R., Cardinali, D.P., Comparative effects of melatonin and vitamin E in restoring aortic relaxation in pancreatectomized rats, *Journal of Physiology and Biochemistry*, 62(3), 207-212 (2006).

Reyes-Toso, C.F., Roson, M.I., Albornoz, L.E., Damiano, P.F., Linares, L.M., Cardinali, D.P., Vascular reactivity in diabetic rats: effect of melatonin , *Journal of Pineal Research*, 33(2),81-86 (2002).

Reyes-Toso, C.F., Linares, L. M., Ricci, C. R., Aran, M., Pinto, J.E., Rodriguez, R.R., Cardinali, D.P., Effect of melatonin on vascular reactivity in pancreatectomized rats , *Life Sciences*, 74 (25), 3085-3092 (2004).

Reyes-Toso, C.F., Linares, L.M., Ricci, C.R., Obaya-Naredo, D., Pinto, J.E., Rodriguez, R.R., Cardinali, D.P., Melatonin restores endothelium-dependent relaxation in aortic rings of pancreatectomized rats, *Journal of Pineal Research*, 39 (4), 386-391 (2005).

Reyes-Toso, C.F., Linares, L.M., Witriw, A., Vazques, M.B., Ricci, C.R., Cardinali, D.P., Antioxidants restore aortic ring relaxation in pancreatectomized rats, *Life Sciences*, 81, (19-20), 1467-1472 (2007).

Robeva, R., Kirilov, G., Tomova, A., Kumanov, P., Melatonin-insulin interactions in patients with metabolic syndrome, *Journal of Pineal Research*, 44 (1), 52-56 (2008).

Sánchez-Barceló, E.J., Mediavilla, M.D., Tan, D.X., Reiter, R.J., Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials, *Current Medicinal Chemistry*, 17, 2070-2095 (2010).

Satake, N., Oe, H., Sawada, T., Shibata S.,The mode of vasorelaxing action of melatonin in rabbit aorta, *Gen. Pharmacol.*, 22, 219–221 (1991a).

- Satake N., Oe H., Shibata S., Vasorelaxing action of melatonin in rat isolated aorta: possible endothelium dependent relaxation, *Gen. Pharmac.* 22(6), 1127-1133 (1991b).
- Satake, N., Shibata, S., Takagi, T., The inhibitory action of melatonin on the contractile response to 5-hydroxytryptamine in various isolated vascular smooth muscles, *Gen. Pharmac.*, 17(5), 553-558 (1986).
- Schepelmann, M., Molcan, L., Uhrova, M., Zeman, H., Ellinger, I., The Presence and localization of melatonin receptors in the rat aorta, *Cell Mol Neurobiol* 31:1257–1265 (2011).
- Sewerynek, E., Melatonin and the cardiovascular system, *Neuro Endocrinol Lett.* 23 Suppl 1:79-83 (2002).
- Silva, C.L.M., Tamura, E.K., Macedo, S.M.D., Cecon, E., Bueno-Alves, L., Farsky, S.H.P., Ferreira, Z.S., Markus, R.P., Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells *in vivo* and *in vitro*, *British Journal of Pharmacology*, 151, 195–205 (2007).
- Simonneaux, V., Ribelayga, C., Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters, *Pharmacol Rev*, 55:325–395 (2003).
- Slominski, R.M., Reiter R.J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R.S., Slominski, A.T., Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 351,152–166 (2012).
- Sobey, C.G., Potassium channel function in vascular disease, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 21:28-38 (2001).
- Socha, M.J., Behringer, E.J., Segal S.S., Calcium and electrical signalling along endothelium of the resistance vasculature, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 110, 80–86 (2011).
- SoRelle, R., Nobel Prize Awarded to Scientists for Nitric Oxide Discoveries, *Circulation*. 98:2365-2366 (1998).
- Standring, S., Borley, N.R., Collins, P., Crossman, A.R., Gatzoulis, M.A., Healy, J.C., Johnson, D., Mahadevan V., Newell R.L.M., Wigley C.B., *Gray's Anatomy, The anatomical basis of clinical practice*, Churchill Livingstone Elsevier, Spain, 240-241 ve 324 (2008).
- Shukla P., Sun, C., O'Rourke, S.T., Melatonin inhibits nitric oxide signaling by increasing PDE5 phosphorylation in coronary arteries, *AJP - Heart*, 303 (12), H1418-H1425 (2012).
- Sudnikovich, E.J., Maksirachik, Y.Z., Zabrodskaia, S.V., Kubyshin, V., Lapshina, E.A., Bryszewska, M., Reiter, R.J., Zavodnik, I.B., Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats, *European Journal of Pharmacology*, 569(3), 180-187 (2007).
- Şener G., Karanlığın hormonu: Melatonin, *Marmara Eczacılık Dergisi* 14: 112-120 (2010).
- Tamura, E.K., Silva, C.L.M., Markus, R.P., Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production *in vitro*, *J. Pineal Res.*, 41, 267–274 (2006).

- Tan, D.X., Manchester, L.C., Terron, M.P., Flores, L.J., Tamura, H., Reiter, R.J., Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance, *J. Pineal Res.* 43:317–320 (2007).
- Thomas, F., Bach, A.G., Mühlbauer, E., Pönicke, K., Brömme, H.J., Welp, A., Peschke, E., Pineal melatonin synthesis is decreased in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats, *Life Sciences*, 85 (13/14), 526-533 (2009).
- Ting, K.N., Dunn, W.R., Davies, D.J., Sugden, D., Delagrange, P., Guardiola-Lemaître, B., Scalbert, E., Wilson, V.G., Studies on the vasoconstrictor action of melatonin and putative melatonin receptor ligands in the tail artery of juvenile Wistar rats, *British Journal of Pharmacology*, 122, 1299-1306 (1997).
- Tunstall, R.R., Shukla, P., Grazul-Bilska, A., Sun, C., O'Rourke, S.T., MT2 receptors mediate the inhibitory effects of melatonin on nitric oxide-induced relaxation of porcine isolated coronary arteries, *JPET.*, 110, 174482 (2010).
- Tunstall, R.R., Shukla, P., Grazul-Bilska, A., Sun, C., O'Rourke S.T., MT2 Receptors Mediate the Inhibitory Effects of Melatonin on Nitric Oxide-Induced Relaxation of Porcine Isolated Coronary Arteries, *JPET* 336:127–133 (2011).
- Viswanathan, M., Laitinen, J.T., Saavedra, J.M., Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 6200-6203 (1990).
- Viswanathan, M., Laitinen, J.T., Saavedra J.M., Differential expression of melatonin receptors in spontaneously hypertensive rats. *Neuroendocrinology* 56, 864-870 (1992).
- Viswanathan, M., Scalbert, E., Delagrange, P., Guardiola-Lemaître, B., Saavedra, J.M., Melatonin receptors mediate contraction of a rat cerebral artery, *Neuroreport: Volume 8 - Issue 18 - p 3847-3849* (1997).
- Weekley, L.B., Melatonin-induced relaxation of rat aorta: interaction with adrenergic agonists, *J Pineal Res.* 11,1:28-34 (1991).
- Winczyk, K., Pawlikowski, M., Guerrero, J.M., Karasek, M., Possible involvement of the nuclear RZR/ROR-alpha receptor in the antitumor action of melatonin on murine Colon 38 cancer. *Tumour Biol. Sep-Oct;23(5):298-302* (2002).
- Winiarska, K., Fraczyk, T., Malinska, D., Drozak, J., Bryla, J., Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in rabbits, *J. Pineal Res.*, 40,168–176 (2006).