

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİRKADİYEN RİTME BAĞLI OLARAK
FİZYOLOJİK MELATONİN SEVİYESİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN
GÖZ VE BEYİN DOKUSUNDA ANTİOKSİDAN ÖNEMİ**

**Tezi Hazırlayan
Mükerrem Betül YERER**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN**

**Fizyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Ekim 2006
KAYSERİ**

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİRKADİYEN RİTME BAĞLI OLARAK
FİZYOLOJİK MELATONİN SEVİYESİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN
GÖZ VE BEYİN DOKUSUNDA ANTİOKSİDAN ÖNEMİ

Tezi Hazırlayan
Mükerrem Betül YERER

Tezi Yöneten
Prof.Dr. Sami AYDOĞAN

Fizyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBY-05-02 nolu
proje ile desteklenmiştir.**

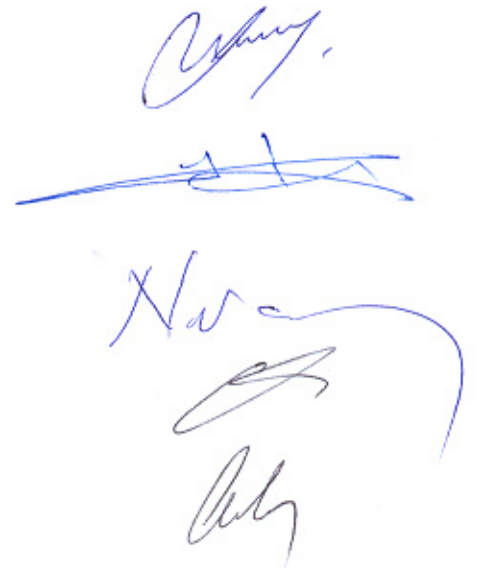
Ekim 2006
KAYSERİ

Prof. Dr. Sami AYDOĞAN Danışmanlığında **Mükerrem Betül YERER** tarafından hazırlanan: **Sirkadiyen Ritme Bağlı Olarak Fizyolojik Melatonin Seviyesindeki Değişikliklerin Göz ve Beyin Dokusunda Antioksidan Önemi** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

11/10/2006

JÜRİ

Başkan : Prof. Dr. Sami AYDOĞAN
Üye : Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR
Üye : Prof. Dr. Nurcan DURSUN
Üye : Prof. Dr. Nazan DOLU
Üye : Prof. Dr. Aydın ERENMEMİŞOĞLU

İmza**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

11/10/2006

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU

TEŞEKKÜR

Çalışmanın her aşamasında bana önderlik eden ve engin bilgileri ile beni aydınlatan ve yönlendiren, sevgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli tez yöneticim Prof. Dr. Sami Aydoğan'a;

Çalışmanın İspanya'da Balearic Islands Üniversitesi'nde gerçekleştirilen kısmında, Anabilim Dalı olanaklarından faydalanmamı sağlayan ve beni davet eden Moleküler Biyoloji ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sn. Prof. Dr. Pilar Roca Salom'a;

Aynı bölümde öğretim üyesi olan ve tezin İspanya'da yapılan kısmı ile ilgili danışmanlığı üstlenen Sn. Prof. Dr. Francesco J. Garcia-Palmer'e;

Çalışmanın deneysel aşamasında mitokondrilerdeki ölçüm yöntemleri ve reseptör dağılımı ile ilgili son teknikleri öğrenmemde ve değerlendirmelerin yapılmasında yardımcı olan ve gerek bilimsel gerekse manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen araştırma görevlisi arkadaşım Maria del Pilar Alcolea Delgado'ya;

Çalışmanın İspanya'da yürütülen kısmında uyumlu bir çalışma ortamı yaratan ve bilgilerini esirgemeyen Balearic Islands Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine;

Çalışmanın Türkiye'de yürütülen kısmında uyumlu bir çalışma ortamı yaratan Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine;

Çalışmanın deneysel kısmında bana destek olan ve moleküler düzeydeki kısımları ile ilgili bilgilerini esirgemeyen arkadaşlarım Dr. Nalan İmamoğlu Şirvanlı ve Dr. Zuhâl Hamurcu'ya;

Çalışmanın İspanya'daki kısmının gerçekleştirilmesinde NATO A2 bursu ile maddi destekte bulunan TÜBİTAK'a ve bu bursla ilgili bütün aşamalarda yardımcı olan TÜBİTAK çalışanlarına;

Tezimin her aşamasında manevi destek, sabır ve yardımlarından dolayı aileme;

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

**SİRKADİYEN RİTME BAĞLI OLARAK
FİZYOLOJİK MELATONİN SEVİYESİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN
GÖZ VE BEYİN DOKUSUNDA ANTIOKSİDAN ÖNEMİ**

ÖZET

Çalışmada farklı sirkadiyen ritimlere tabi tutulmak suretiyle biyolojik saatleri değiştirilmiş sıçanlarda plazma melatonin düzeyindeki değişikliklerin, pineal bezde melatonin reseptör dağılımının ve bu değişikliklerin beyin ve göz dokusu mitokondrilerinde ve eritrositlerde antioksidan savunma sistemi üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Deneyler; Erciyes Üniversitesi Deneysel Klinik Araştırma Merkezi'nden sağlanan 90-120 günlük, ortalama 200-250 gr ağırlığında, her biri 10'ar adet Swiss Albino erkek sıçandan oluşan 5 grup üzerinde gerçekleştirildi. Gruplara sırasıyla; 12/12 s (saat), 0/24 s, 24/0 s, 8/16 s ve 16/8 s A/K (aydınlık/karanlık) döngüleri, özel havalandırması olan ve ışık döngüsü ayarlanabilen özel sirkadiyen ritim kafeslerinde bir hafta süre ile uygulandı. Pineal bezde Melatonin 1 (MT1) ve Melatonin 2 (MT2) reseptörlerinin ekspresyonu, plazma melatonin düzeyleri, beyin ve göz dokusu mitokondrial antioksidan enzimlerinden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süper oksit dismutaz (Mn-SOD) enzim aktiviteleri, eritrosit antioksidan enzimlerinden GSH-Px, Katalaz (CAT) enzim aktiviteleri ve lipid peroksidasyonu son ürünü malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü.

Pineal bezde MT1 ve MT 2 reseptörleri sürekli ışığa maruz bırakılan grup olan 24/0 s A/K grubunda kontrol grubuna göre down-regüle olurken, karanlığa maruz bırakılan 0/24 s A/K grubunda up-regüle olmuştur. Bu değerler plazma melatonin düzeyleri ile de orantılıdır. En yüksek plazma melatonin düzeyi 0/24 s A/K grubunda görülürken, en düşük düzey ise 24/0 s A/K grubunda bulunmuştur. Ayrıca beyin ve gözde GSH-Px aktivitesi, önemli derecede bütün gruplarda artarken, Mn-SOD aktivitesi beyinde 0/24 ve 24/0 s A/K gruplarında düşük bulunmuş, gözde ise 0/24 s ve 8/16 s A/K gruplarında diğer gruplara göre düşük bulunmuştur. Eritrositlerde ise GSH-Px aktivitesinin bütün gruplarda kontrole göre yüksek olduğu, ancak katalaz aktivitesinin 8/16 s A/K grubunda düşük olduğu ve MDA düzeylerinin bu grupta yüksek olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak, elde edilen bulgular aydınlık- karanlık döngüsünün değiştirilmesi ile değişen plazma melatonin düzeylerinin pineal bez melatonin reseptör ekspresyonunda muhtemel bir otheregülasyon mekanizmasında rol alabileceğini göstermiştir. Ayrıca bu değişiklikler beyin ve göz dokusu mitokondrilerinde ve eritrosit antioksidan savunma sisteminde önemli değişikliklere neden olmuştur. Bu nedenle, farklı ışık döngüsüne maruziyetin beyin ve göz dokusunda oksidatif hasar açısından oldukça önemli bir faktör olduğu ve yapılan çalışmalarda mutlaka dikkate alınması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: sirkadiyen ritim, melatonin, mitokondri, antioksidan enzimler, pineal bez

**THE ANTIOXIDANT IMPORTANCE OF THE PHYSIOLOGIC MELATONIN LEVELS
VIA CIRCADIAN RHYTHM ALTERATIONS ON BRAIN AND EYE MITOCHONDRIA**

ABSTRACT

In this study, the plasma melatonin levels and pineal gland melatonin receptor expressions in rats which had been exposed to different circadian rhythms were investigated. Furthermore the effects of these alterations in erythrocyte antioxidant system and in the brain and eye mitochondrial antioxidant defense system were evaluated.

Experiments were conducted on the 90-120 days old, 200-250 gr weight Swiss Albino rats obtained from the University of Erciyes Experimental and Clinical Research Centre in five groups, comprising of 10 rats in each. 12/12 h (hours), 0/24 h, 24/0 h, 8/16 h and 16/8 h L/D (Light/Dark) cycles were applied, respectively in special circadian rhythm cages where the climate and the duration of the light can be adjusted. Pineal gland Melatonin 1 (MT1) and Melatonin 2 (MT2) receptor expressions, plasma melatonin levels, brain and eye mitochondrial antioxidant enzyme (glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (Mn-SOD) activities, erythrocyte antioxidant enzyme GSH-Px and Catalase (CAT)) activities and malondialdehyde (MDA) levels as an end-product of the lipid peroxidation in the erythrocyte membrane were measured.

Plasma MT1 and MT2 receptors were down-regulated in 24/0 h L/D group compared to the control whereas they are up-regulated in the 0/24 h L/D group. These results are correlated with the plasma melatonin levels. The highest plasma melatonin levels were in 0/24 h L/D group where the lowest value was in 24/0 h L/D group. Furthermore, the GSH-Px activity was found to be higher in all the groups compared to control whereas the Mn-SOD levels were found to be lower in 0/24 and 24/0h L/D groups in brain mitochondria and in 0/24h and 8/16 h L/D groups in the eye mitochondria. Moreover, in erythrocytes the GSH-Px activity was higher in all the groups compared to control. However, the CAT activity was shown to be lower in 8/16 h L/D group where the MDA levels are shown to be the highest in this group.

As a result, the data revealed that circadian rhythm alterations caused changes the plasma melatonin levels which probably have an autoregulation mechanism on the melatonin receptors in the pineal gland. Furthermore, it has also affected the brain and eye mitochondrial antioxidant enzymes and erythrocyte antioxidant defense system. For this reason, exposure to different L/D cycles is a crucial factor for the brain and eye mitochondrial oxidative damage and should be taken into account in all mitochondrial investigations.

Key words: circadian rhythm, melatonin, mitochondria, antioxidant enzymes, pineal gland

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	I
KABUL ONAY SAYFASI.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
KISALTMALAR.....	VIII
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. SİRKADYEN RİTM VE BİYOLOJİK SAAT.....	3
2.1.1. Biyolojik Saat Çeşitleri.....	4
2.1.2. Ritimlerin İç ve Dış Kontrolü.....	5
2.1.3. Sirkadiyen Saatlerin Konumu.....	7
2.1.4. Retina –SCN Yolu.....	8
2.1.5. Biyolojik Saatlerin Moleküler Biyolojisi.....	9
2.2. MELATONİN.....	10
2.2.1. Melatoninin Biyolojik Etkileri.....	13
2.2.2. Melatoninin Antioksidan Etkileri.....	17
2.3. MİTOKONDRİ VE GÖREVLERİ.....	19
2.3.1. Mitokondri.....	19
2.3.2. Oksidatif Fosforilasyon.....	20
2.3.3. Elektron Transport Zinciri.....	21
2.3.4. Mitokondrielerde Oksidatif Stres ve Antioksidan Mekanizmalar...	25
2.3.5. Melatonin ve Mitokondri.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. DENEY GRUPLARI.....	32
3.2. PLAZMA MELATONİN DÜZEYİNİN ÖLÇÜLMESİ.....	33
3.3. MELATONİN RESEPTÖR EKSPRESYONUNUN ÖLÇÜLMESİ.....	34
3.4. MİTOKONDRİ İZOLASYONU.....	41
3.5. MİTOKONDRİLERDE GSH-Px AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	41
3.6. MİTOKONDRİLERDE Mn-SOD AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	42
3.7. MİTOKONDRİLERDE PROTEİN TAYİNİ.....	44
3.8. ERİTROSİTLERDE GSH-Px AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	45

VII

3.9. ERİTROSİTLERDE CAT AKTİVİTESİ TAYİNİ.....	45
3.10. ERİTROSİTLERDE MDA TAYİNİ.....	45
3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. PLAZMA MELATONİN DÜZEYLERİ.....	48
4.2. MELATONİN RESEPTÖR EKSPRESYONU.....	49
4.2.1. MT1 reseptör ekspresyonu.....	50
4.2.2. MT2 reseptör ekspresyonu.....	51
4.2.3. 18S Housekeeping geni.....	53
4.2.4. β -Actin Housekeeping geni.....	54
4.3. BEYİN DOKUSU MİTOKONDRİLERİNDEKİ BULGULAR.....	55
4.3.1. Beyin Mitokondrilerinde GSH-Px Aktivitesi.....	55
4.3.2. Beyin Mitokondrilerinde Mn-SOD Aktivitesi.....	56
4.4. GÖZ DOKUSU MİTOKONDRİLERİNDEKİ BULGULAR.....	57
4.4.1. Göz Mitokondrilerinde GSH-Px Aktivitesi.....	57
4.4.2. Göz Mitokondrilerinde Mn-SOD Aktivitesi.....	58
4.5. ERİTROSİTLERDEKİ BULGULAR.....	59
4.5.1. Eritrositlerde GSH-Px Aktivitesi.....	59
4.5.2. Eritrositlerde CAT Aktivitesi.....	60
4.5.3. Eritrositlerde MDA düzeyleri.....	61
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	62
6. KAYNAKLAR.....	79
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

VIII

KISALTMALAR

A	: Adenin
AANAT	: Arilalkilamin N-asetil transferaz
ADP	: Adenozin difosfat
AFMK	: N1-aseti-N2-formil-5-metoksi kyanuramin
A/K	: Aydınlık /Karanlık döngüsü
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz enzimi
BSA	:Bovine serum albumin
C	: Sitozin
CAT	: Katalaz
Ca ⁺²	: Kalsiyum
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
cDNA	: komplementer deoksiribo nükleik asit
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CO ₂	: Karbondioksit
Cu	: Bakır
CuCl ₂	: Bakır klorür
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EGTA	: Etilen glikol tetra asetik asit
ELISA	: Enzim Bağlı İmmün Assay
ETZ	: Elektron transport zinciri
FAD	: Falvin adenin dinükleotid
Fe ⁺²	: Ferrik demir
Fe ⁺³	: Ferröz demir
FMN	: Flavin mono nükleotid
G	: Guanin
G6PD	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GnRH	: Gonadotropin Saliverici hormon
GSH	: Redükte glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutatyon
GSSG-Rd	: Glutatyon redüktaz

IX

Hb	: Hemoglobin
HCl	: Hidroklorik asit
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
IL	: İnterleukin
K ⁺	: Potasyum
L/D	: Light/Dark
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
MDA	: Malondialdehit
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
Mn	: Mangan
MPT	: Mitokondrial geçiş poru
MPP	: Mitokondrial pore permeabilizasyonu
mRNA	: haberci ribo nükleik asit
MT1	:Yüksek afiniteli melatonin reseptörü alt tipi
MT2	: Düşük afiniteli melatonin reseptörü alt tipi
Na ⁺	: Sodyum
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NaN ₃	: Sodyum azid
NBT	: Nitroblue tetrazolium
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentetaz
O ₂	: Oksijen
O ₂ [•]	: Süperoksit radikali
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyonu
OD	: Optik dansite
OH [•]	: Hidroksil radikali
ONOO ⁻	: Peroksinitrit anyonu
Pi	: Fosfat
Per	: Period geni
PER	: Period proteini
PZR	: Polimer zincir reaksiyonu (PCR)
REM	: Rapid Eye movement
RNA	: Ribonükleik asit
R [•]	: Organik radikal

RO•	: Alkoxi radikali
S	: Saat
SCN	: Suprakiazmatik nükleus
SOD	: Süperoksit Dismutaz
T	: Timin
Tm	: Erime noktası
TBA	: Tiyobarbitürik asit
t-BHP	: Ter-bütil hidro peroksit
TCA	: Trikloro asetik asit
Tim	: Timeless geni
TİM	: Timeless proteini
UQH2	: Ubikinol
UV	: Ultraviyole
XOD	: Ksantin oksidaz
Zn	: Çinko

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. İnsanlarda gözlenen ritim örnekleri	05
Tablo 2.2. İnsanın 24 saati içerisinde, sirkadiyen ritim gösteren olaylara bağlı olarak önemli hadiseler.....	06
Tablo 4.1. MT1 reseptörüne ait mRNA ekspresyonu değerlendirme tablosu.....	51
Tablo 4.2. MT2 reseptörüne ait mRNA ekspresyonu değerlendirme tablosu.....	52
Şekil 2.1. İki biyolojik fonksiyonun ritimleri arasında gözlenen faz ilişkileri ve ritim özellikleri.....	04
Şekil 2.2. Retina-SCN Yolu.....	08
Şekil 2.3. N-asetil-5metoksitriptamin (Melatonin).....	10
Şekil 2.4. Melatonin sentezi.....	11
Şekil 2.5. Melatonin sentezinin kontrolü.....	12
Şekil 2.6. Melatoninin immün sistem üzerine etkileri.....	16
Şekil 2.7. Melatoninin antioksidan fonksiyonu.....	17
Şekil 2.8. Oksidatif fosforilasyon.....	21
Şekil 2.9. Elektron Transport Zinciri.....	22
Şekil 2.10. ATPaz (Kompleks V)'in yapısı.....	24
Şekil 2.11. Mitokondri içzarında oksidan ve antioksidan mekanizmalar.....	27
Şekil 2.12. Melatoninin mitokondri iç zarındaki antioksidan rolü.....	29
Şekil 2.13. Melatoninin mitokondriiler aracılı apoptozisin önlenmesindeki önemi.....	30
Şekil 3.1. MT1 reseptörü için agaroz jel elektroforezi sonuçları.....	35
Şekil 3.2. MT2 reseptörü için agaroz jel elektroforezi sonuçları.....	36
Şekil 3.3. Gerçek zamanlı PZR sisteminde SYBR Green I boyası ile interkalatör boya yöntemi esasının şematik gösterimi.....	36
Şekil 3.4. Gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu sistemi şematik gösterimi.....	37
Şekil 3.5. MT1 reseptörüne ait standart eğri.....	40
Şekil 3.6. MT2 reseptörüne ait standart eğri.....	40

Şekil 3.7. Malondialdehit standart eğrisi.....	46
Şekil 4.1. Plazma melatonin düzeyleri.....	49
Şekil 4.2. MT1 reseptörü mRNA ekspresyonu kuantifikasyon eğrisi	50
Şekil 4.3. MT1 reseptörü mRNA ekspresyonu erime noktası tayini eğrisi.....	50
Şekil 4.4. MT2 reseptörü mRNA ekspresyonu kuantifikasyon eğrisi.....	51
Şekil 4.5. MT2 reseptörü mRNA ekspresyonu erime noktası tayini eğrisi.....	52
Şekil 4.6. 18S geni mRNA ekspresyonu kuantifikasyon eğrisi.....	53
Şekil 4.7. 18S geni mRNA ekspresyonu erime noktası tayini eğrisi.....	53
Şekil 4.8. β -Actin mRNA ekspresyonu kuantifikasyon eğrisi.....	54
Şekil 4.9. β -Actin mRNA ekspresyonu erime noktası tayini eğrisi.....	54
Şekil 4.10. Beyinde mitokondrial GSH-Px aktivitesi.....	55
Şekil 4.11. Beyinde mitokondrial Mn-SOD aktivitesi.....	56
Şekil 4.12. Gözde mitokondrial GSH-Px aktivitesi.....	57
Şekil 4.13. Gözde mitokondrial Mn-SOD aktivitesi.....	58
Şekil 4.14. Eritrositlerde GSH-Px aktivitesi.....	59
Şekil 4.15. Eritrositlerde CAT aktivitesi.....	60
Şekil 4.16. Eritrositlerde MDA düzeyleri	61

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronobiyoloji alanındaki son gelişmeler, biyolojik saatlerin vücuttaki fizyolojik mekanizmalar üzerinde zannedilenden çok daha fazla ve çok yönlü etkilerinin olduğunu göstermiştir. Memelilerde biyolojik saatlerin en önemlilerinden biri gece-gündüz ritmini sağlayan sirkadiyen ritimdir. Bu canlılarda sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde başlıca pineal bez ve suprakiazmatik nükleus (SCN) görev alır. Melatonin ise pineal bez tarafından salgılanan ve ritmi düzenlemekle görevli olan endojen bir hormon olup, 1950'li yılların sonuna doğru varlığı tanımlanmıştır. Pineal bez memelilerde fotik informasyonları nöroendokrin sinyallere dönüştürmektedir. Retinadan algılanan görsel bilgiler, hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeği ve sempatik sinir sistemi yoluyla pineal beze yansıtılır. Melatonin sentez ve salgılanması, karanlıkta uyarılırken, ışık ile baskılanmaktadır. Gün ışığının bulunduğu saatlerde, retinadaki fotoreseptör hücreleri hiperpolarizedir, bu da norepinefrin salgılanmasını baskılar. Karanlıkla birlikte polarize olan fotoreseptör hücreler norepinefrin salgırlar. Norepinefrin, hem triptofanın dolaşımından beze girişini artırmakta, hem de pinealosit membranındaki beta1 adrenerjik reseptörleri aracılığı ile membrandaki adenil siklazı aktive ederek, siklik adenozin mono fosfat (cAMP) yapımını artırmaktadır. cAMP etkisiyle melatonin sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan Arilakrilamin-N-asetil transferaz aktivitesi yükselmekte ve melatonin sentezi başlamaktadır.

Pineal bezden dolaşıma verilen melatonin lipofilik özelliğinden dolayı direkt olarak veya spesifik reseptörler aracılığıyla hedef hücrelere ulaşır. İnsan beyninin çeşitli bölgelerinde, bağırsaklarda, overlerde, kan damarları, lenfositlerde, plateletlerde ve karaciğerde de melatonin reseptörlerinin varlığı tespit edilmiştir.

Retina ve pineal bezdeki melatonin reseptör düzeylerinin up-regülasyonu veya down-regülasyonu aracılığı ile biyolojik ritim değişikliklerine uyumun sağlanmasının yanı sıra daha pek çok düzenleyici role sahip olabileceği düşünülmektedir. Bunların da başında melatoninin antioksidan etkileri gelmektedir. Antioksidan özelliği 1993 yılında ilk kez gösterilen melatonin, lipofilik özelliğinden dolayı organizmada çok geniş alanda etki gösterebilmektedir. Organizmalar, serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasara karşı kendilerini koruyabilmek için, birçok savunma mekanizmasına sahiptirler. Bu mekanizmaların başında da süper oksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri gelmektedir. Özellikle de mitokondrilerdeki elektron transport zinciri reaksiyonları sonucunda oluşan serbest radikallerin miktarının artması nedeniyle oksidatif stres oluşması, bu antioksidan savunma sistemi ile engellenmektedir. Melatonin, kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçebilir, hücrelerin çekirdekleri dahil tüm organellere ulaşabilir. Bu özellik, dejeneratif veya proliferatif değişikliklere neden olan hastalıklara karşı makromoleküllerin ve özellikle mitokondri ve DNA'nın oksidatif hasardan korunmasında melatonine bir üstünlük kazandırmaktadır.

Bu nedenle, fizyolojik melatonin düzeylerindeki değişikliklerin, retina ve beyin dokusunda bir antioksidan olarak etkinliğinin araştırılmasının dejeneratif ve proliferatif birçok hastalığın tedavisine ışık tutacağı düşünülmektedir. Sirkadiyen ritme sahip olan melatoninin farklı dozlardaki uygulamalarının bazı fizyopatolojik olaylarda antioksidan etkileri gösterilmiştir. Ancak farklı aydınlık/karanlık döngüleri uygulandığında melatoninin göz ve beyine ait mitokondrilerde fizyolojik etkileri ve bunların antioksidan mekanizmalarla açıklanması henüz netlik kazanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, farklı aydınlık/karanlık döngüsü uygulamalarında vücutta fizyolojik olarak sentezlenen melatonin düzeyleri ve bu fizyolojik düzeylerin pineal bezdeki melatonin reseptörlerinin ekspresyonu üzerine etkilerinin ve regülasyon mekanizmalarının aydınlatılması, ve bu düzeylerin gerek göz gerekse beyin dokusunda antioksidan etkinliğinin mitokondrilerde incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SİRKADİYEN RİTİM VE BİYOLOJİK SAAT

Canlıların birçok biyolojik faaliyetlerinde belli bir ritmin gözlemlendiği çok eski zamanlarda fark edilmiştir. Ne var ki, biyolojik ritimlerin başlı başına bir bilim dalı olması ancak 19. yüzyılın sonlarına rastlar. Bugün bildiğimiz anlamda, biyolojik ritimleri ve onları yöneten etkenleri araştıran bilim dalı “kronobiyoloji” olarak adlandırılır (1,2).

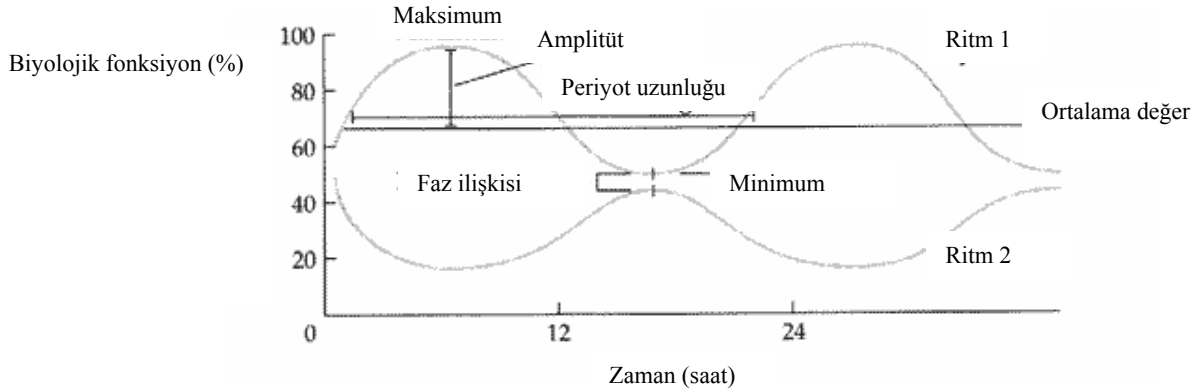
Kronobiyoloji, biyolojik ritimlerle ilgilenir. Ritim genel olarak; periyot (devir), sıklık, büyüklük ve faz gibi özellikler gösteren, tekrarlayıcı karakterdeki olaylar olarak tanımlanabilir. Ritimlerin bu özelliklerinin kısa tanımları ise şu şekilde yapılabilir:

Periyot (Period; Devir): Ritmin bir döngüsü için geçen zaman.

Sıklık (Frequency; Frekans): Birim zamanda tekrarlayan döngü sayısı.

Genlik (Amplitude; Amplitüd): Ortalama değerden sapma miktarı.

Evre (Phase; Faz): Ritmin kendine has özellikler gösteren kısmı (başlama ve bitiş evreleri gibi) (Şekil 2.1) (3-6).



Şekil 2.1. İki biyolojik fonksiyonun ritimleri arasında gözlenen faz ilişkileri ve ritim özellikleri

Canlıların yürüttüğü biyolojik fonksiyonların ritimleri, genellikle çevre şartlarından döngüsel özellikler gösterenlerle eşzamanlı olarak yürür. Eğer bir canlı engelsiz bir şekilde dış ortamla ilişkili ise ve ritimlerini dış dünyadan gelen uyarılara göre düzenleyebiliyorsa, böyle ritimlere bağlı (entrained) ritimler denir. Bunun yanında, eğer canlı, laboratuvar ortamında, çevresel işaretlerden yalıtılmış bir biçimde yetiştirilirse, bu durumda tam olarak çevresel işaretlerle tutarlı olmasa da, bir iç ritmi sürdürdüğü görülür. Bu tip ritimlere de serbest (free-running) ritimler denir (3).

Canlının çevreden aldığı sinyallerin bir kısmı, ritimlerini düzenlemesi için bir işaret görevi yapar. Örneğin, ışık ve karanlık, canlının gece ve gündüz göstereceği faaliyetleri ayarlaması için çevresel bir işaret olarak kullanılır. Bunun gibi çevresel işaretlere, zeitgeber (almanca, zeit=zaman, geber=vermek) veya "ritim verici" denir. Bu ritim verici faktörler, ayın devri, yılın mevsimleri, güneşin durumu vb. olabileceği gibi, bunların arasında en önemlisi ışıktır (6,7).

2.1.1. Biyolojik Saat Çeşitleri

Genel adlandırmaya göre, temel biyolojik saat çeşitleri aşağıdaki gibidir (6,7):

- Sirkadiyen (Sirkadian: Dünyanın dönüşü): 24 saat 22-26 saat
- Ultradian: <20 saat
- Infradian: >28 saat
- Sirkaseptan: 7 ± 3 gün
- Sirkadiseptan: 14 ± 3 gün
- Sirkavijintan: 21 ± 3 gün
- Sirkatrivijintan: 30 ± 5 gün
- Sirkatidal: 11-14 saat
- Sirkalunar: 26-30 gün
- Sirannual: 330-400 gün

Tablo 2.1. İnsanlarda gözlenen ritim örnekleri

RİTİM SIKLIĞI	FİZYOLOJİK VE DAVRANIŞSAL OSİLYASYON
ULTRADİAN RİTİM	
Saniyede 1'den fazla döngü	Görme ve işitme sistemleri, EEG dalgaları
Dakikada 1'den fazla döngü	Kalp hızı, solunum sayısı, mide hareketleri
Saatte 1'den fazla döngü	Kan dolaşımı, çeşitli enzim aktiviteleri
Günde 1'den fazla döngü	Yeme, içme, idrar çıkarma, dışkılama, REM/nonREM uyku basamakları
SİRKADİAN RİTİM	
Günde yaklaşık 1 döngü	Uyku-Uyanıklık, vücut ısı dalgalanmaları, kan basıncı, yorgunluk-dinçlik, ruh durumu, stres, fiziksel ve zihinsel performans
İNFRADİAN RİTİM	
Her ay döngüsünde 1 döngü	Menstruel döngü, insan ve primatlarda ayın evrelerine menstruel döngünün kilitlenmesi, memeli gebelik süresinde 30 günlük ortak çarpanlar, erkeklerde yaklaşık 21-28 günlük testosteron salınım döngüsü
Yılda yaklaşık 1 döngü	İnsan ve memeli hayvan doğumları, SADS (Mevsimsel afektif bozukluk sendromu), serebrovasküler kazalar ve solunum kaynaklı ölümler, ani bebek ölümleri, kazalar, hastalıklar, cinayet, intihar.

2.1.2. Ritimlerin İç ve Dış Kontrolü

Biyolojik ritimlerin, canlının içinden bir mekanizma tarafından mı yoksa dışarıdaki işaretlere göre mi ayarlandığı konusundaki tartışmalar spekülatif düzeyde uzun yıllar boyu devam etmiştir. Canlılardaki ritim mekanizmasının iç bir kaynaktan yönetildiğine dair ilk deneysel kanıtlar, Jan-Jaques d'Ortous de Marian adlı araştırmacıdan 1700'lerde gelmiştir (8). Bu araştırmacı heliotropik (güneşte yaprak veya çiçeklerini açıp, karanlıkta kapatan) bitkilerde yaptığı çalışmalar sonucu, bu bitkilerdeki ritimlerin, ışık olmasa da

faaliyet gösterebildiklerini kanıtlamıştır. De Marian ünlü deneyinde, heliotropik bir bitki türünün iki örneğinden birini tamamen karanlıkta, bir diğerini de normal güneş gören bir yerde muhafaza etmiştir. Bir süre sonra, karanlıkta yetişen bitkinin de aynı güneşteki türdeşi gibi, gündüz vakti yapraklarını açıp, gece kapattığını gözlemlemiştir. Günümüzde birçok canlının iç ve dış kaynaklı ritimlere sahip olduğu bilinmektedir. İnsanlarda sirkadiyen ritim gösteren olaylar aşağıdaki tabloda verilmiştir:

Tablo 2.2. İnsanın 24 saati içerisinde, sirkadiyen ritim gösteren olaylara bağlı olarak önemli hadiseler

İNSANIN 24 SAATI	
1:00	Hamile kadınlarda doğumun başlaması T _{yardımcı} hücrelerinin sayısı en fazla
2:00	Büyüme hormonunun düzeyi en yüksek
4:00	Astım ataklarının başlamasına en uygun zaman
6:00	Menstruasyon başlangıcı Kandaki insülin seviyesi en düşük Kan basıncı ve kalp hızı artmaya başlar Kortizol seviyesi azami
7:00	Saman nezlesi semptomları için en uygun saatler
8:00	Kalp krizi riski en yüksek Yardımcı T hücreleri en düşük düzeyde
ÖĞLEN	Hemoglobin düzeyinin en yüksek olduğu saatler
15:00	Tutma kuvveti, solunum hızı, refleks duyarlılığı en fazla
16:00	Vücut ısısı, nabız ve kan basıncı en yüksek
18:00	İdrar oluşum hızı en fazla
21:00	Ağrı eşiği en düşük düzeyde
23:00	Allerjik cevaplar için en uygun saatler

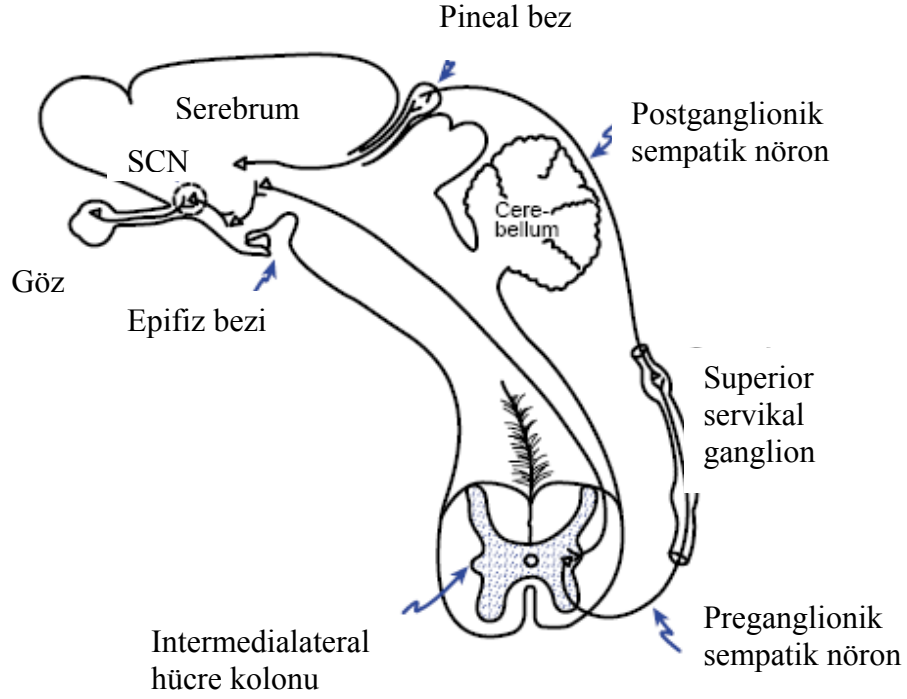
2.1.3. Sirkadiyen Saatlerin Konumu

Sirkadiyen saatlerin çalışması, vücutta belli bazı bölgelerin kontrolünde ise de, aslında tek hücreli canlılarda bile ritimlerin varlığı söz konusu olduğundan, biyolojik saatlerin hücre düzeyindeki osilasyonlarla (salınımlarla) düzenlendiği söylenebilir. Biyolojik ritimlerin temelini oluşturan mekanizmalar hücresel düzeyde iş gördüğünden, hücre fonksiyonu üzerine etkili birçok faktör, doğrudan ritimlere de etkir. Bunlardan en önemlileri, başta K^+ ve Ca^{+2} olmak üzere, hücredeki temel fonksiyonları yürüten iyonların dengeleri ve hücrenin fonksiyonunu kontrol eden önemli birimlerinden biri olan hücre zarının yapısındaki değişimlerdir.

Organ düzeyinde sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesinden, beyinde bulunan ve suprakiazmatik çekirdek (SCN) adı verilen yapı sorumludur. Bu yapı, hipotalamusun ön kısmında, optik çaprazın (chiasma opticum) hemen üst kısmında yer alan bir hücre grubudur. Bu bölge, retinadan özel girişler aldığı gibi, başta epifiz (pineal) bezi olmak üzere, birçok bölgeyle de doğrudan veya dolaylı ilişki içerisindedir (Şekil 2.2)(9).

SCN'nin sirkadiyen ritimleri yönetmesi, özellikle yakın zamanlarda yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Başka ritim üreten bölgeler olsa da, SCN bir "üst saat" gibi iş görür ve diğer ritmik fonksiyon gösteren hücrelerin faaliyetlerini düzenler. SCN'nin ritimleri düzenlediğine dair kanıtlar ise şöyle sıralanabilir:

- İn vitro (vücut dışı) SCN hücre kültürleri, sirkadiyen bir elektriksel ritme sahiptirler.
- SCN nakli (transplantasyonu) sonrası, alıcının ritmi, vericinin ritmine uyar.
- SCN'nin metabolik aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda, 2-deoksiglukoz enjeksiyonu ile, bu bölgenin glikoz kullanma miktarı ölçülmüştür. Glikoz kullanma, metabolik olarak aktif olmayla eşdeğer olduğundan, bu veriler, SCN'nin hangi durumlarda daha fazla aktif olduğunu göstermek bakımından önemlidir. Bu çalışmalar sonucunda SCN'nin, aydınlıkta (ışık varlığında) metabolik olarak aktif, karanlıkta ise nispeten inaktif olduğu anlaşılmıştır (3,11).



Şekil 2.2. Retina-SCN Yolu

2.1.4. Retina-SCN Yolu

SCN'nin ışıkla aktive olması, retinadan bu bölgeye bir bağlantı olmasını gerekli kılar. Zira yapılan çalışmalar, retinadaki bazı özel ışık algılayıcı hücrelerden çıkan ve optik yol dışında bir yolla SCN'ye ulaşan bir sinir demetinin varlığını göstermektedir. Bu yola "retinohipotalamik yol" adı verilmektedir.

Bunun yanında, retinadan SCN'ye bir de dolaylı yol bulunmaktadır. Bu yol, optik sinirle giden görme uyarılarının genikulat çekirdekler denen bölgelerdeki nöron ağları tarafından SCN'ye yönlendirilmesi sayesinde oluşur. Bu yolda kullanılan sinir ileti maddesinin Nöropeptid Y olduğu ortaya konmuştur. Bu yollarla retinadaki ışık durumundan haberdar edilen SCN, Şekil 2'de gösterildiği gibi, diğer beyin bölgelerini uyararak, canlının vücut ritimlerini düzenlemesini sağlar (3-6).

SCN üzerinde yapılan diğer çalışmalar, bu bölgenin çok sayıda sinir ileti maddesi içerdiğini belirlemiştir. Bu bölgede yer alan sinir ileti maddelerinden önemlileri: Nöropeptid Y, Vazopressin, Vazoaktif İntestinal Polipeptid (VIP), gonadotropin salgılatıcı hormonu (GnRH) ve somatostatindir (7,9).

2.1.5. Biyolojik Saatlerin Moleküler Mekanizması

Biyolojik saatler üzerine yapılan çalışmalar, hücre düzeyindeki ritimlerin varlığını ortaya koymaya başladığından bu yana, hücre içinde böyle bir ritim oluşturabilecek bir moleküler saat mekanizmasının bulunabilmesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır (10,11). Henüz tam olarak aydınlatılamamış ve üzerinde halen yoğun olarak çalışıyor olsa da, hücresel düzeyde ritimlerin nasıl ayarlandığına dair moleküler ve genetik bir takım mekanizmalar ortaya çıkarılmaya başlanmıştır.

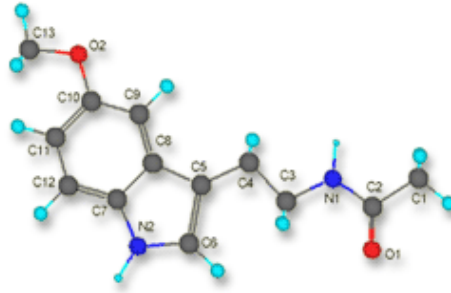
Meyve sinekleri (*Drosophila melanogaster*) üzerinde yapılan çalışmalar, ritmin hücresel düzeyde düzenlenmesi konusundaki temel genetik mekanizmanın ortaya çıkmasını sağlamıştır (13). Buna göre meyve sineklerinde ilk önce, mutasyonu sonucu hayvanlarda günlük ritimlere uyma davranışının ortadan kalktığı bir gen tespit edilmiş ve bu gene *per* (period) adı verilmiştir. *Per* geninin ürünleri, hem ritmi oluşturmakta, hem de ritmin hızını belirlemektedir. Daha sonra keşfedilen bir başka gen ise *tim* (timeless) olarak adlandırılmıştır. Bu genin ürünleri de yine sirkadiyen ritmin oluşabilmesi için gereklidir. Bu iki genin ürünü olan *PER* ve *TIM* proteinleri, zaman oluşturu bir kimyasal geri-besleme devresi gibi davranarak, hücresel ritmin düzenlenmesi için gereken metabolik uyarlamaların gerçekleştirilmesi için bir anahtar gibi iş görmektedirler (3).

Hücresel saatin mekanizması; *PER* ve *TIM* proteinleri: Meyve sineği ışığa maruz kaldığında, sineklerin beyin hücrelerinde bulunan *PER-TIM* protein bileşkeleri birbirlerinden ayrılarak, *PER* ve *TIM* proteinleri şeklinde dağılmaya başlarlar. *PER-TIM* kompleksi, *PER* ve *TIM* proteinlerini kodlayan *per* ve *tim* genlerinin aktivitesini baskılamak gibi bir role sahiptir. Işıkla karşılaşılın bu saati sabah olarak kabul edersek, öğle saatleri civarında *PER* ve *TIM* proteinleri tamamen dağılmaya başladığında, *CYCLE* ve *CLOCK* adındaki diğer iki proteininin hücre içinde artma dönemi başlar. Bu iki protein birleşip bir kompleks yaparlar ve bu kompleks, *per* ve *tim* genlerini aktifleyerek *PER* ve *TIM* proteinlerinin yapılmasını başlatır. Bu yapım işlemi, akşam saatlerinde gereken derişimde *PER-TIM* kompleksinin oluşumu ile devam eder. Gece saatlerinde, *PER-TIM* kompleksleri hücre çekirdeğinde, *CLOCK* ve *CYCLE* proteinlerini üreten genlerin aktivitelerini baskırlarlar. Bu baskılama, *CYCLE-CLOCK* kompleksi *PER* ve *TIM* proteinlerinin yapımını başlattığından, *PER* ve *TIM* proteinlerinin kendi üretimlerini baskılaması anlamına gelir. Sabah saatlerinde ışığın

etkisiyle PER-TIM komplekslerinin yine parçalanmaya başlaması, döngüyü yeniden başlatır. Bu temel mekanizma, memeliler ve insan da dahil olmak üzere, bir çok canlıda ortak bir temel mekanizmadır. İnsanda bir kaç farklı protein ve gen ilave olarak bu sisteme katılmaktadır. Fakat kesin mekanizma henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır (9).

2.2. MELATONİN

Melatonin ilk kez 1958 yılında kurbağa ve balıkların melanositlerinde bulunan bir renk pigmenti olarak tanımlanmış (14) ancak daha sonra 1993 yılında melatoninin bütün memeli hayvanlarda bulunan ve pineal bezden salınan ve canlıların biyolojik ritmini düzenleyen bir hormon olduğu gösterilmiştir. Hatta 1996 yılından sonra da omurgasızlar ve protozoalar da dahil olmak üzere birçok canlının yapısında varlığı ispatlanmıştır (Şekil 2.3)(2).



Şekil 2.3. N-asetil-5metoksitriptamin (Melatonin)

Pineal Bez

Pineal bez (epifiz bezi), insanlarda üçüncü ventrikülün arkasında yer alır. Total vücut ağırlığına göre oldukça küçük olan bu bez (insanlarda 50-150 mg), böbrekten sonra vücudun en çok kan akımına sahip ikinci organıdır. Bezin yapısı, bez hücrelerinin çoğunu oluşturan ve gerek indolaminleri (çoğunluğu melatonin) gerekse peptidleri (arjinin, vazotosin v.b) üreten pinealositler ve nöroglia hücreleri olmak üzere iki hücre türünden oluşur. Pineal bez, memelilerde fotik informasyonları nöroendokrin sinyallere dönüştürür. Retinadan algılanan görsel bilgiler, hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeği ve sempatik sinir sistemi yoluyla, pineal beze yansıtılır (15). Fotik impulslar taşıyan sempatik efferent lifler pineal beze ulaştığında, özellikle karanlıkta, norepinefrinin pinealosit membranında beta-adrenerjik reseptöre bağlanması ile bir seri reaksiyon

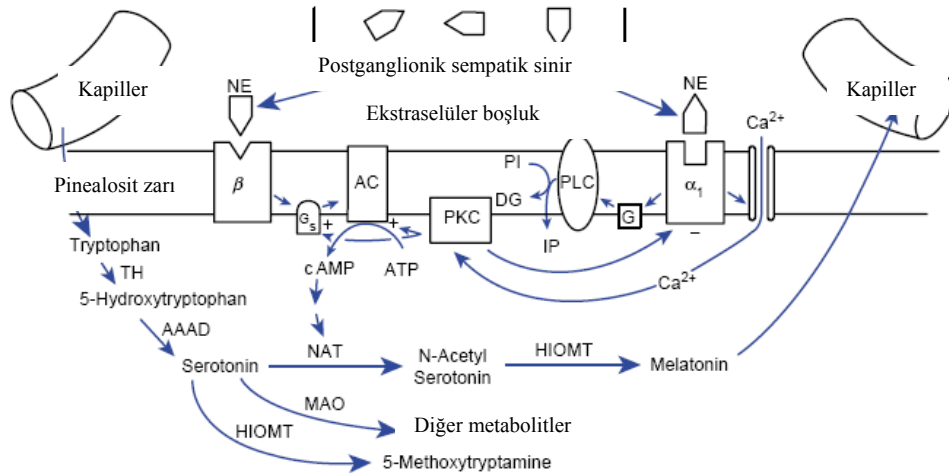
başlar. Membranda adenil siklaz aktivitesi ve dolayısıyla cAMP yapımı stimüle olur; cAMP de melatonin ve diğer indolaminlerin biyosentezini katalizleyen enzimleri aktive eder (16).

Melatonin Sentezi

Melatonin diğer adıyla N-asetil-5-metoksitriptamin ilk kez sığır pineal ekstrelerinde melanin granüllerini agrege etme ve kurbağa derisinin rengini açma yeteneği fark edilerek tanımlanmıştır (14).

Melatonin biyosentezi, kandan beze difüze olan triptofanın, pineal bezde triptofan hidroksilaz enzimi ile hidrosillenmesiyle başlar. Böylece meydana gelen 5-hidroksi triptofan, L-aromatik aminoasit dekarboksilaz enzimi ile karboksil grubunu kaybeder ve neticede serotonin (5-hidroksi triptamin) meydana gelir. Pineal bez, serotonin konsantrasyonu açısından vücutta en zengin organdır.

Serotonin asetilasyonu, N-asetil transferaz aracılığı ile gerçekleşir. Burada Asetil CoA, asetil donörü olarak rol oynar. Meydana gelen N-asetil serotonin, metil donörü olarak S-adenozilmetionin'in kullandığı ve hidroksi indol-O-metil transferaz'ın katalizlediği son basamakta N-asetil 5-metoksitriptamin; melatonin'e dönüşür ve böylece melatonin biyosentezi tamamlanır (15,17).



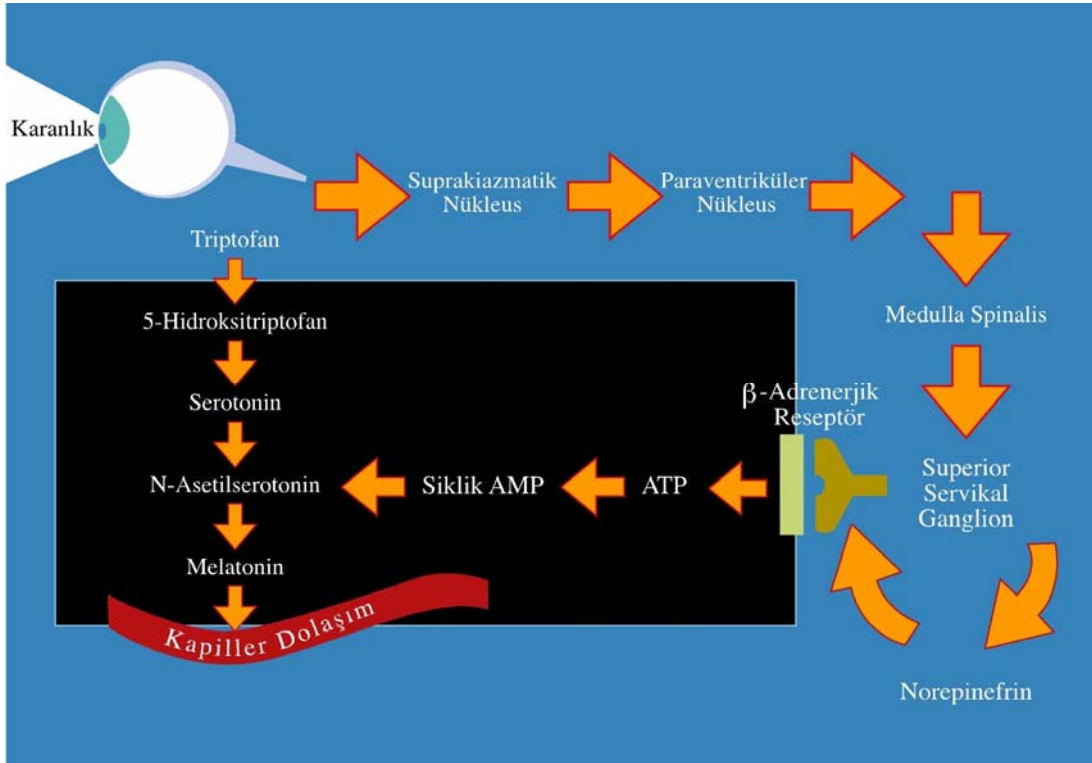
Şekil 2.4. Melatonin sentezi

Bu mekanizmada hız kısıtlayıcı enzim aril-alkilamin-N-asetil transferaz (AANAT) olarak adlandırılan enzimdir. Bu enzim, β ve α -1 adrenerjik reseptörler üzerinden etki gösteren epinefrinin nokturnal sempatik salımına yol açar. Bu enzimin negatif feedback

mekanizmaları ile düzenlenmesinde ise cAMP, ICER, MAP kinaz fosfataz 1 gibi birçok enzim ve proteinin rol aldığı bilinmektedir (Şekil 2.4) (18).

Melatonin Sentezinin Kontrolü

Melatonin salgısı, canlı türlerine göre farklılık gösteren sirkadiyen bir ritme sahiptir. Bu farklılık, hormonun gece pikinin meydana geldiği saatler ve süreleri ile ilgilidir. Serum melatonin konsantrasyonu, geceleri gündüze göre 3-10 kat daha yüksektir. Melatonin salgısının sirkadiyen ritmi endojen kökenlidir, bu da uyarıların suprakiazmatik çekirdekten çıktığını yansıtır (17). Melatonin sentezi ve salgılanması karanlıkta uyarılırken, ışık ile baskılanır. Gün ışığının bulunduğu saatlerde, retinadaki fotoreseptör hücreleri hiperpolarizedir; bu da norepinefrin salınmasını baskılar. Karanlıkla birlikte polarize olan fotoreseptör hücreler norepinefrin salgırlar. Norepinefrin hem triptofanın dolaşımdan beze girişini artırmakta, hem de pinealosit membranındaki β -1 reseptörleri aracılığıyla membrandaki adenil siklazı aktive ederek, hücre içi siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyelerini yükseltmektedir. cAMP etkisiyle, melatonin sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan N-asetil transferaz aktivitesi yükselmekte, böylece melatonin sentez ve salgılanması başlamaktadır. Melatonin sentez ve salımı arttıkça hormon, pasif difüzyonla dolaşıma geçer (Şekil 2.5)(19).



Şekil 2.5. Melatonin sentezinin kontrolü

Melatoninin Etki Mekanizması ve İnaktivasyonu

Pineal bezden dolaşıma verilen melatonin lipofilik özelliğinden dolayı direkt olarak veya spesifik reseptörler aracılığıyla hedef hücrelere ulaşır (19). İnsan beynin çeşitli bölgelerinde, bağırsaklarda, overlerde, kan damarlarında ve karaciğerde, melatonin reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. Farmakolojik ve kinetik gruplara ait zara bağlı iki melatonin bağlanma yeri tanımlanmıştır: MT1 (yüksek afinite (pikomolar)) yerleri ve MT2 (düşük afinite (nanomolar)) yerleri (20,21). MT1 reseptörlerinin aktivasyonu hedef hücrelerde adenilat siklaz aktivitesinin baskılanmasına neden olur. MT1 reseptörü aracılığı ile, termoregülasyonda, arterial vazokonstriksiyonda, kanser hücrelerinin proliferasyonunda, üreme ve metabolik fonksiyonlarda rol alır. MT2 reseptörü aracılığıyla ise, SCN'deki nöronal termoregülasyonda, retinada dopamin salgısının inhibisyonunda, vazodilatasyonun indüklenmesinde, arterial yatakta lökosit rulo formasyonunun oluşumunun engellenmesinde ve immun cevabın artırılmasında rol oynadığı bilinmektedir (22)

Lipofilik özelliği nedeniyle hücrenin tüm fraksiyonlarına kolaylıkla girebilen melatoninin (23), sitozolik ve nükleer bağlanma yerleri de tanımlanmıştır. Örneğin; sitozolik kalmodulin'e bağlanarak adenilat siklaz, fosfodiesteraz gibi hedef enzimlerle olduğu kadar yapısal proteinlerle de etkileşerek doğrudan kalsiyum geçişi üzerinde de etki gösterebilir (24).

Melatoninin inaktivasyonu, başlıca karaciğerde gerçekleşir. İndol halkasının 6. konumundan hidroksile olan melatonin, daha sonra sülfat ve glukronik asitle konjuge edilerek idrarla atılır. Melatoninin idrardaki başlıca metaboliti 6-sülfatoksi melatonin olup, plazma melatonin düzeyinin iyi bir göstergesidir. Diğer önemli metaboliti ise; N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) molekülüdür (25).

2.2.1. Melatoninin Biyolojik Etkileri

Melatoninin uyku, sirkadiyen ritim, duygu durumu, cinsel olgunlaşma ve üreme, kanser, termoregülasyon ve yaşlanma gibi birçok biyolojik olayla ilişkili olduğu bildirilmiştir (25).

Melatoninin Uyku ve Sirkadiyen Ritim Üzerine Etkileri

Ekzojen melatoninin beyin elektriksel aktivitelerini dengeleyici etkisiyle (alfa beyin dalgasının oluşumunu artırmak suretiyle) uykuya dalma süresini kısalttığı, total uyku

periyodu esnasında uykudan uyanış sayısını azalttığı, uyku kalitesini artırdığı ve hipnotik etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Bunu yanında melatonin, beyinde monoamin nörotransmitter düzeylerini etkileyerek uyku mekanizmalarını aktive etmektedir. Uykuya dalma gücünü çeken yaşlılarda serum melatonin konsantrasyonları yetersiz bulunmuştur. Elektrofizyolojik kayıtlarda da gece uyku halinde en keskin artış ile, idrarda 6-sülfoksimelatonin atılımı arasında önemli bir korelasyon saptanmıştır (26). Melatoninin uyku kalitesi, REM ve non-REM uyku üzerine etkilerinin birçok parametrenin rol aldığı oldukça karmaşık bir mekanizma olduğu bilinmektedir (22). Bu mekanizma içinde başta SCN olmak üzere biyolojik osilatörler olarak adlandırılan yapıların önemli rolü vardır. Bu nedenle son dönemlerde yapılan çalışmalar, bu osilatörlerin resetlendiği gece vardiyası çalışmaları ya da jet lag etkisi ile gün geçtikçe netlik kazanmaktadır (7,27).

Melatoninin Cinsel Olgunluk ve Üreme Üzerine Etkileri

Melatonin eksikliğinin erkek çocuklarda hipofiz-gonad işlevini aktive edebileceğini destekleyen çalışmalar ortaya koymuştur. Çocukluk ve adölesan döneminde melatonin serum düzeylerindeki gece piki değerlerindeki azalmanın, salgılanan hormon miktarındaki azalmadan mı, yoksa artan vücut kitlesinden mi kaynaklandığı kesinlik kazanmamıştır (28).

Normal sağlıklı kadınlarda melatonin salgısı, menstruasyon döngüsünde değişiklik göstermez. Benzer şekilde normal döngüleri olan infertil kadınlarda serum estradiol düzeylerindeki belirgin artışlar, melatonin salgısını etkilememektedir. Ancak melatonin, overler tarafından salgılanan ve prolaktin yapımını idame ettiren estradiol salgısını baskılamaktadır. Bunun yanında, serum melatonin konsantrasyonları, hipotalamik amenorezi olan kadınlarda artmaktadır. Hipogonadotropik hipogonadizmlilerde de serum melatonin düzeyleri artmıştır ve testosteron tedavisine yanıt olarak düşer. Bu bulgular melatonin salgısının, seks steroidlerin üretimini etkileyebileceğini ortaya koymaktadır (29).

Ayrıca son yıllarda protein kinaz A aktivitesini ve cAMP düzeylerini düşürmesi nedeniyle ve gonadotropin salıverici hormon ile indüklenmiş gonadotropin yapımını azaltması nedeniyle üreme sistemi üzerine etkileri oldukça netlik kazanmıştır. GnRH'ın etkisini ise Ca^{+2} akışını azaltmak suretiyle inhibe ettiği gösterilmiştir (30).

Melatoninin Yaşlanma Üzerine Etkileri

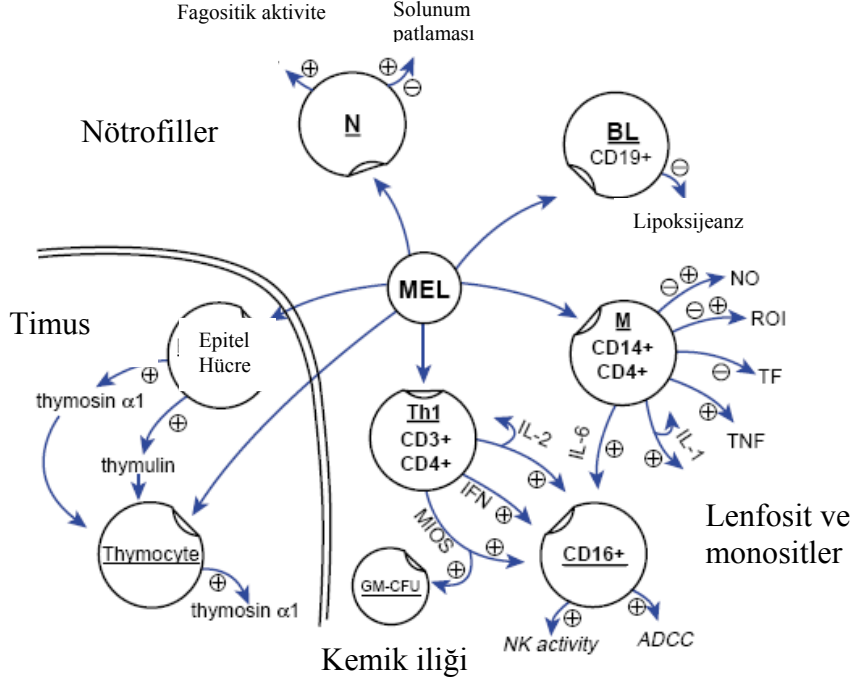
Pineal bezden melatonin üretimi, insan ve hayvanlarda yaşlanmayla birlikte belirgin olarak azalmaktadır. Yaşlılıkta, nöronlar üzerine serbest radikal saldırısı, birçok nörodejeneratif durumların oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Eksitatör aminoasit nörotransmitterlerin serbest radikal oluşumuna yol açtıkları gösterilmiştir. Sinir sonlanmaları bulunan beyin alanları, eksitatör aminoasitleri salgıladığından, bu alanlar diğer beyin alanlarına göre daha çabuk hasara uğramaktadırlar. Melatoninin yaşlanma ile birlikte azalması da, zararlı oksijen radikalleri ile oluşturulan hasarı artırır. Melatonin düzeyinin azalması, birçok dokuda guanilat siklaz aktivitesinin azalmasına neden olur. Bunun neticesinde hücre zar kalınlığı ve rijiditesi artarak dejeneratif hasar oluşumu hızlanır. Çapraz bağ atması sonucu hücrelere besin girişi ve metabolik artıkların atılımı zorlaşır. Bütün bunlar aterosklerotik değişiklikleri de içeren yaşlılıkla ilgili birçok sürecin oluşmasına yola açar. Antioksidanların kapasitelerinin azalması ile serbest radikal üretimin de artması, yaşlanma süreci, şizofreni, tardiv diskinezi ve Parkinson hastalığının fizyopatolojisinde rol oynar. Melatonin, serbest radikallerce oluşturulan nörotoksisiteyi engelleyebildiğinden, yaşın ilerlemesi ile melatonin salımının azalması yaşlanma sürecini kolaylaştırmaktadır. Melatoninin yaşlanmaya karşı koruyucu etkisi, serbest radikallerin oluşturduğu hücre hasarını azaltmak ya da immüniteyi düzenlemek suretiyle kendini gösterir (31).

Melatonin ayrıca nörodejeneratif hastalıkların birçoğunda önemli etkileri olan nitrik oksit molekülü ile de yakından ilişkili olması nedeniyle yaşlanma sürecinde doğrudan ve dolaylı olarak birçok etkiye sahiptir. Bu nedenle de bu tip hastalıklarda ve yaşlanmaya karşı koruyucu özelliği nedeniyle terapötik ajan olarak kullanımı üzerine de oldukça önemli çalışmalar vardır (32).

Melatoninin İmmünite Üzerine Etkileri

Melatonin, immün cevabı artırarak bazı biyolojik etkilere yol açmaktadır (tümör büyümesinin baskılanması ve stresin neden olduğu immün baskılanmanın ortadan kaldırılması gibi). Fareler üzerinde yapılan araştırmalar melatoninin kemik iliği T-lenfosit hücrelerinde interlökin-4 (IL-4) yapımını ve stroma hücrelerinde granülosit-makrofaj koloni stimulan faktör yapımını uyardığını, ayrıca kemik iliği hücrelerini, sitotoksik bileşimlerin neden olduğu apoptozisten koruduğunu göstermiştir (33).

Melatoninin immün sistem molekülleri üzerine olan etkileri aşağıdaki şemada kısaca özetlenmiştir (33).



Şekil 2.6. Melatoninin immün sistem üzerine etkileri

Melatonin ve Kanser

Melatonin mitojenik aktiviteyi azaltmakta, kanserli dokuda hücre proliferasyonunu durdurmakta, meme bezinde kemoterapik ajanlar gibi antiöstrojen etki göstermek suretiyle anti-tümoral etki yapmaktadır. Ayrıca tümör büyümesini hızlandıran prolaktin, büyüme hormonu, gonadotropinler gibi hormonların salımını baskıladığı (30) ve bayanlarda meme kanserinde oldukça etkili olduğu (29) bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu ürünleri ile karsinogenez oluşumu arasında bir ilişki söz konusudur. Melatoninin oldukça güçlü antioksidan etkisi, serbest radikal aracılı kanser oluşumunu önlemektedir (5).

Melatonin ve Ateroskleroz

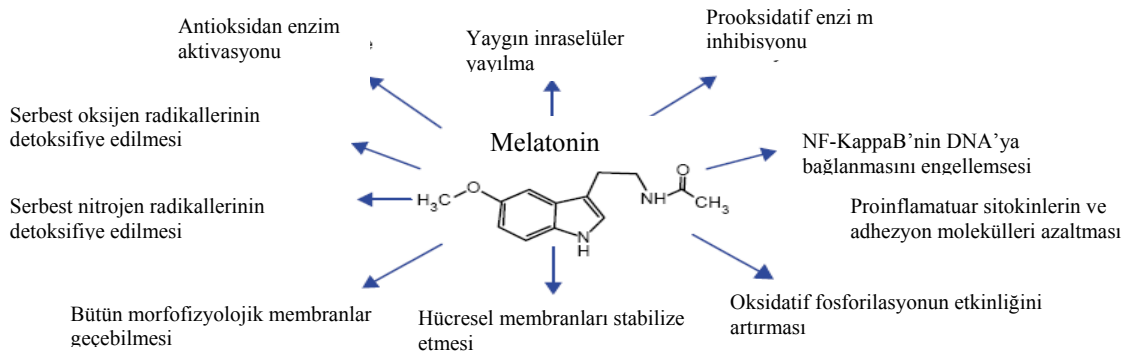
Ateroskleroz patogeneğinde, lipid peroksidasyonu önemli bir role sahiptir. Damar endotelinin oksijen radikalleri ve lipid peroksidlerine karşı çok duyarlı olması, serbest radikallerin vasküler düz kas proliferasyonunun artmasına yol açmaktadır. Melatonin güçlü antioksidan etkisi ile aterosklerozun önlenmesini sağlamaktadır. Melatoninin kolesterol metabolizmasını düzenleyici etki gösterdiği, düşük dansiteli lipoprotein

(LDL) reseptör sayısını azaltarak LDL metabolizmasında rol oynadığı bildirilmiştir (34).

2.2.2. Melatoninin Antioksidan Etkileri

Başta kalp hastalıkları ve kanser olmak üzere birçok dejeneratif hastalıkların etiolojisinden serbest radikal hasarı sorumlu tutulmaktadır. Antioksidan moleküller bu hasarı önlemektedirler. Melatoninin de antioksidan etkisi in vivo (35) ve in vitro (36) çalışmalarla gösterilmiştir. Melatonin yapısında bulunan pirol halkası nedeniyle O_2 ve OH^\bullet radikallerini yakalamada yüksek bir kapasiteye sahiptir. Toksik hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek, bütün hücre kompartmanlarındaki biyomolekülleri, serbest radikal oluşumuna karşı bölgesel olarak yerinde korur. Çok reaktif olan hidroksil radikallerinin yıkıcı etkilerine karşı primer nonenzimatik savunma mekanizmasını oluşturur ve yapılan araştırmalarda organizmayı oksidatif hasara karşı korumada melatonin bilinen diğer antioksidanlardan (mannitol, glutasyon, E vitamini, askorbik asit gibi) daha etkili görülmüştür (37). Askorbik asit (C vitamini), alfa-tokoferol (E vitamini) ve glutasyon (GSH) gibi antioksidanlardan farklı olarak, melatonin peroksid radikalini yakalayıp yayılmakta olan lipid peroksidasyonunu sonlandırmaktadır. Melatoninin bu etkilerinin diğer antioksidanlardan daha güçlü olduğu, in vitro (36) ve in vivo (35) çalışmalarda gösterilmiştir.

Melatonin direkt antioksidan etkilerinin yanı sıra, dolaylı olarak da antioksidan sisteme katkıda bulunur. Sıçanlarda karaciğer, böbrek ve beyin dokusu glutasyon peroksidaz aktivitesinin, melatonin uygulandıktan sonra arttığı gözlenmiştir. Pinealektomi yapılan sıçanların karaciğer, akciğer ve beyin dokusu glutasyon peroksidaz aktivitesinde anlamlı düşüşler saptanmıştır (37).



Şekil 2.7. Melatoninin antioksidan fonksiyonu

1993 yılında antioksidan özelliği ortaya çıkarılan melatonin (38), lipofilik özelliğinden dolayı organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Melatonin, kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçebilir, hücrelerin çekirdekleri dahil tüm organellerine ulaşabilir. Bu özellik, dejeneratif ya da proliferatif değişikliklere neden olan hastalıklara karşı makromoleküllerin ve özellikle DNA'nın oksidatif hasardan korunmasında melatonine bir üstünlük kazandırmaktadır. Ancak bu antioksidan etkiler, melatoninin gece ulaştığı doruk değerlerin çok üstündeki değerlerde görülür. Melatoninin bu bağlamda başka bir üstünlüğü, diğer bazı antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300mg/gün) ve uzun süre (5 yıl) kullanımda bile toksik etkisinin görülmemesidir (39).

Son yıllarda melatoninin doğrudan serbest radikalleri temizleme özelliğinin yanı sıra, ekzojen melatonin verilmesinin, önemli bir antioksidan enzim olan glutatyon peroksidaz aktivitesini de artırdığı gösterilmiştir (37).

Ayrıca melatoninin; birçok fizyolojik ve patofizyolojik olayda rol alan önemli bir molekül olan nitrik oksit (NO)'in, sentezi ve dolaşımdaki miktarı üzerine etkilerini inceleyen birçok çalışma yapılmıştır. NO'nun fizyolojik etkisi; çözünebilir guanilat siklazın cGMP oluşturmak üzere aktive olmasıyla gerçekleşmektedir. Melatonin düzeyinin azalması birçok dokuda guanilat siklaz aktivitesinin azalmasına neden olur. Bunun sonucu olarak cGMP düzeyi azalır, cAMP düzeyi artar. Böylece hücre membran kalınlığı ve rijiditesi artarak dejeneratif hasar oluşumu hızlanır. Yaşlanma sürecinin incelenmesi sırasında ortaya çıkan bu özelliği melatoninin, nitrik oksit sentaz enziminin aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesine neden olmuş ve bu çalışmalar sonucunda melatoninin aynı zamanda oldukça etkili bir nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü olduğu bulunmuştur (40). NO ile melatonin arasındaki ilişki incelendiğinde, melatoninin NO ile nitrosomelatonin oluşturmak üzere reaksiyona girdiği (41) ve O₂ varlığında NO ile O₂'nin reaksiyona girmesi sonucu oluşan peroksinitrit anyonunun da melatonin tarafından tutulduğu ileri sürülmüştür (42).

Melatoninin gerek doğrudan gerekse dolaylı yollarla oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerinin bulunması kardiyovasküler hastalıklar, kanser, ateroskleroz, sepsis gibi oksidatif hasarın rol oynadığı patolojik olaylardaki öneminin gün geçtikçe artmasına neden olmaktadır.

2.3. MİTOKONDİRİ VE GÖREVLERİ

2.3.1 Mitokondri

Mitokondri kelimesi Yunanca mitos (iplik) ve khondrion (tane) kelimelerinden üretilmiştir. Mitokondriler oksijenli solunum yapan ökaryotik hücrelerde bulunan ve esas olarak hücrede enerjinin adenosin trifosfat (ATP) molekülleri şeklinde yapıldığı kimyasal olaylarla ilgili olan hücre organelleridir. Prokaryotik hücrelerde ve memelilerin alyuvarlarında bulunmaz. Mitokondriler sitoplazmanın her yerinde bulunur. Bazı hücreler sadece bir büyük mitokondri içerebilse de çoğunlukla büyük sayılarda bulunurlar. Bir karaciğer hücresinde sayıları 2500 civarına ulaşabilir. Boyları 0,2-5 mikron arasında değişir. Şekilleri ise ovalden çubuğa kadar değişkenlik göstermektedir. Hücreler tarafından kullanılan ATP'nin çoğu oksijen kullanan ve karbondioksit oluşturan olaylar zinciri ile mitokondrilerde oluşur (43).

Mitokondriler bir iç ve bir dış zarla çevrili küresel veya oval çubuk şekilli yapılardır. Zarlar çift katlı fosfolipid tabaka ve bunun içine gömülü proteinlerden oluşur; yapısal olarak hücre zarına benzer. Dış zar düz, iç zar ise krista olarak bilinen iç zar yüzeyini artırmaya yönelik yapılarla matriks adı verilen iç komponente uzanır. Zarlar arası boşluk yaklaşık 40-80 Å genişliğindedir. Sitozole eşdeğer bir içeriğe sahiptir (44).

Mitokondri iç zarı yoğun fonksiyonel özelliğinden dolayı diğer zarlara göre daha fazla protein içerir. İç zarın yapısının %70'ini proteinler, %30'unu lipidler ve çok az bir kısmını ise kolesterol oluşturur. Zarın lipid içeriğinde bulunan kardiolipin maddesi zardan geçişi kısıtlayıcı bir özellik gösterir. İç zarda 3 tip protein bulunur: i) Elektron transport zincirinin oksidasyon reaksiyonlarını gerçekleştiren proteinler (enzimler, sitokromlar vb.) ii) Matrikste ATP yapımını gerçekleştiren ATP sentetaz iii) Metabolitlerin matrikse giriş çıkışını düzenleyen permeaz adı verilen transport proteinleri (44).

Mitokondri dış zarı ise iç zara göre daha kalın olup plazma membranına benzer. Porin adı verilen kanal proteinleri, büyüklüğü 5000 dalton ve daha küçük olan moleküllerin geçişini sağlar. Ayrıca dış zarda mitokondriye ait lipid sentezi ile ilişkili enzimler ve lipid substratları matrikste metabolize olabilecek formlara dönüştüren enzimler bulunur (43). Mitokondrial (mitokondriye ait) matriks çeşitli enzimlerin yanı sıra ribozomlar, tRNA, proteinler ve küçük bir miktar da DNA molekülü barındırır. Bu da mitokondriyi

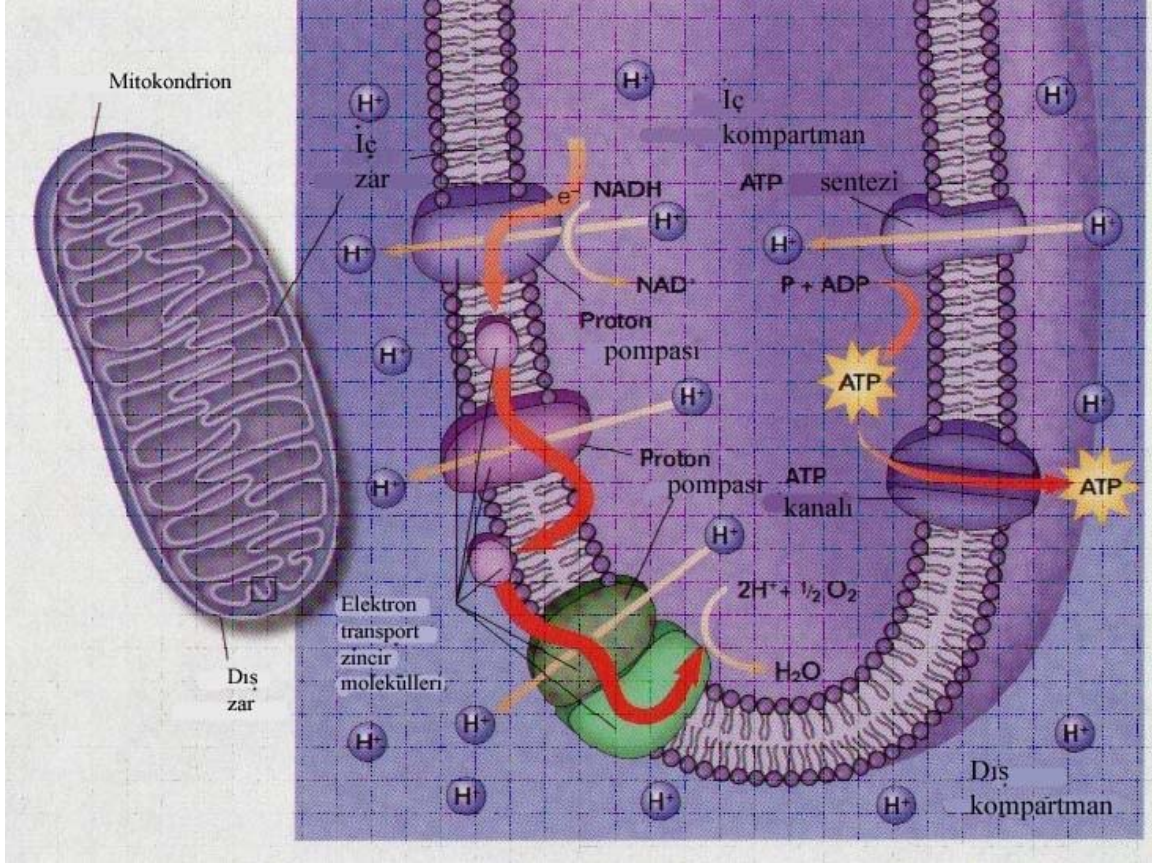
bazı diğerk organellerden ayırır. Matrikste az sayıda granül de bulunur. Hücre içindeki kalsiyum, magnezyum gibi katyonların fazlası mitokondriye geçerek granüllere bağlanır. Depolanan bu katyonlar gerektiğinde sitozole verilir. Mitokondri matriksi piruvat, aminoasitler ve yağ asitlerinin oksidasyonundan sorumlu enzimleri ve trikarboksilik asit (TCA) siklusu enzimlerini içerir. Üre ve hem sentezinin bir kısmı mitokondrilerde gerçekleştirilir. Ayrıca nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve flavin adenin dinükleotid (FAD⁺) ile ATP sentezi için gerekli olan adenozin difosfat (ADP) ve fosfat (Pi) içerir (44).

2.3.2. Oksidatif Fosforilasyon

Çok karmaşık reaksiyonlardan oluşmalarına rağmen glikoliz, sitrik asit döngüsü, dehidrojenasyon ve dekarboksilasyon süreçleri esnasında az miktarda ATP oluşur. Tek bir glikoz molekülünün metabolizması sırasında glikolizde ve sitrik asit döngüsünde 2'şer ATP molekülü oluşur. Glikoz metabolizması sırasında oluşan toplam ATP'nin %90'ı glikoz yıkımının bu ilk aşamalarında açığa çıkan hidrojen atomlarının daha sonra oksidasyonu sırasında oluşur. Bu ilk aşamaların temel fonksiyonu glikoz molekülündeki hidrojenleri oksidasyon için kullanılacak hale getirmektir.

Hidrojenin oksidasyonu mitokondrilerde enzimatik olarak katalize edilen bir seri reaksiyon sonucu gerçekleşir: i) Her bir hidrojen atomu bir hidrojen iyonuyla bir elektrona ayrılır. ii) Elektronlar daha sonra erimiş haldeki oksijenle hidroksil iyonlarını oluşturmak üzere kullanılır. iii) Hidrojen ve hidroksil iyonları su oluşturmak üzere birleşir. Oksidatif reaksiyonlar zinciri sırasında açığa çıkan çok büyük miktardaki enerji ATP oluşumunda tüketilir. Bu yoldan ATP oluşumuna oksidatif fosforilasyon denir. Oksidatif fosforilasyon kemiozmotik mekanizma adı verilen ileri derecede özgünleşmiş bir mekanizma ile tamamen mitokondrilerde gerçekleşir (Şekil 2.8) (44,45).

Mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyonun ilk basamağı besinlerden ayrılan hidrojen atomlarının iyonizasyonudur. Bu hidrojen atomları çiftler çiftler ayrılır: Bunlardan biri derhal H⁺ iyonuna dönüşür, diğeri de NADH oluşturmak üzere NAD⁺'ya bağlanır. İlk olarak NADH'dan hidrojen atomunun da ayrılmasıyla bir H⁺ iyonu daha oluşur, ayrılan NAD⁺ ise bu süreçte tekrar tekrar kullanılır. Hidrojen atomlarından ayrılarak iyonizasyona neden olan elektronlar derhal mitokondrinin iç zarının bir integral parçası olan elektron transport zincirine (ETZ) girerler (45).



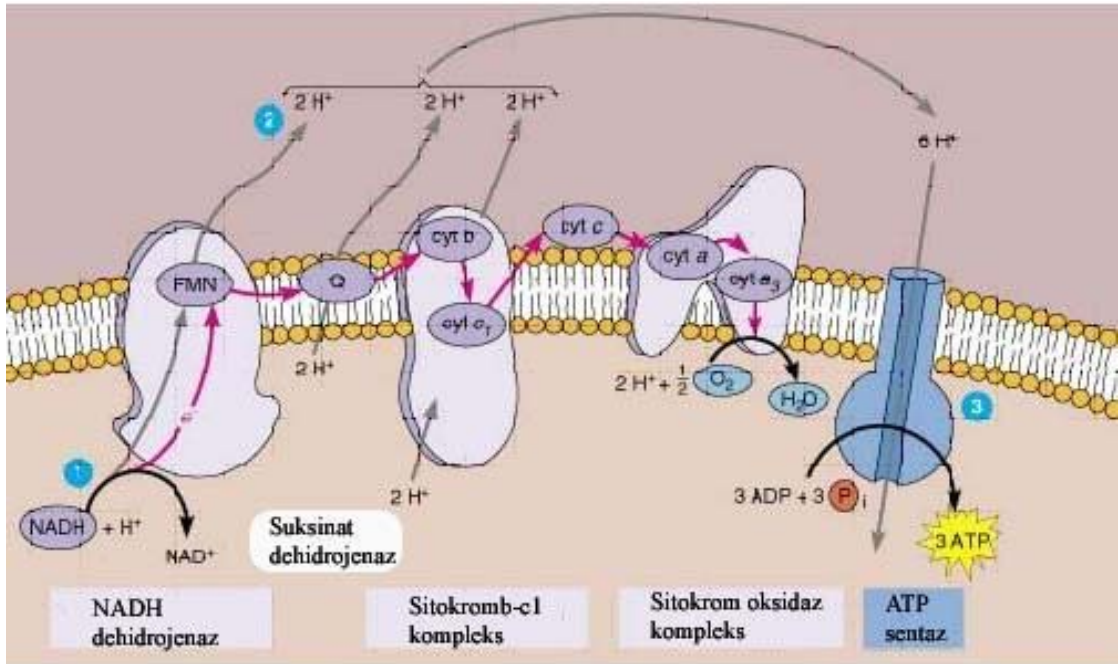
Şekil 2.8. Oksidatif fosforilasyon

2.3.3. Elektron Transport Zinciri

Glukoz, yağ asidi gibi enerjiden zengin moleküller sonunda karbondioksit (CO_2) ve su oluşan bir dizi oksidasyon reaksiyonu ile metabolize olurlar. Bu reaksiyonların metabolik ara ürünleri elektronlarını özelleşmiş koenzimler olan NAD^+ ve FAD 'a vererek enerjiden zengin indirgenmiş koenzimler (NADH ve FADH_2) oluştururlar. Bu indirgenmiş koenzimler elektron transport zinciri adı verilen bir grup özelleşmiş elektron taşıyıcısına bir çift elektron verirler. Elektronlar, elektron transport zincirinde ilerledikçe, serbest enerjilerinin büyük bir kısmını kaybederler. Bu enerjinin bir bölümü ADP ve P_i 'tan ATP sentezlenerek tutulabilir. Bu işlem ise oksidatif fosforilasyon ile tanımlanır. ATP olarak yakalanamayan serbest enerjinin kalan bölümü ise ısı olarak salınır (44).

Mitokondri iç zarında elektron transport zinciri başlıca beş ayrı enzim kompleksinden oluşur. Bunlara Kompleks I, II, III, IV ve V adı verilir. Kompleks I-IV'ün her birisi elektron transport zincirinin bir bölümünü içerir (Şekil 2.9). Kompleks V ise ATP sentezini katalize eder. Her kompleks elektronlarını koenzim Q ve sitokrom c gibi

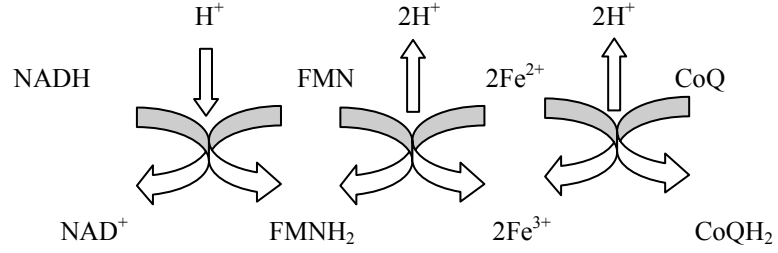
göreceli olarak hareketli elektron taşıyıcılarına verir. Elektron transport zincirinin her taşıyıcısı bir elektron vericisinden elektronlarını alır ve daha sonra en sonunda su oluşturmak için oksijen ve protonlarla birleşmek üzere zincirdeki bir sonraki taşıyıcıya verir. Elektron transport işlemini solunum zinciri yapan, bu oksijen gereksinimidir ve vücudun oksijen tüketiminin en büyük bölümü burada gerçekleşir (42-44).



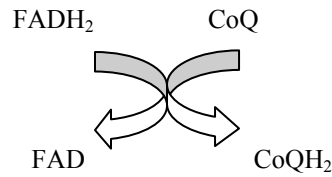
Şekil 2.9. Elektron Transport zinciri

Elektron transport zinciri reaksiyonları:

Kompleks I (NADH Dehidrojenaz) : NADH'ın NAD^+ 'ya oksidasyonunu gerçekleştiren enzimdir. Bu dönüşüm esnasında açığa çıkan hidrojen iyonları, flavin mono nükleotid (FMN)'e aktarılır ve FMNH_2 oluşur. Kompleks I ayrıca demir-kükürt merkezleri oluşturmak üzere kükürt atomları ile çiftler oluşturmuş birkaç demir atomu da içerir. Bunlar hidrojen atomlarının zincirin bir sonraki üyesi olan ubikinona aktarılması için gereklidir (44).



Kompleks II (Süksinat Dehidrogenaz): Süksinatın Fumarata okside olması esnasında açığa çıkan hidrojen iyonlarının FAD da FADH₂'ye indirilmesi esnasında kullanılan enzimdir (44).

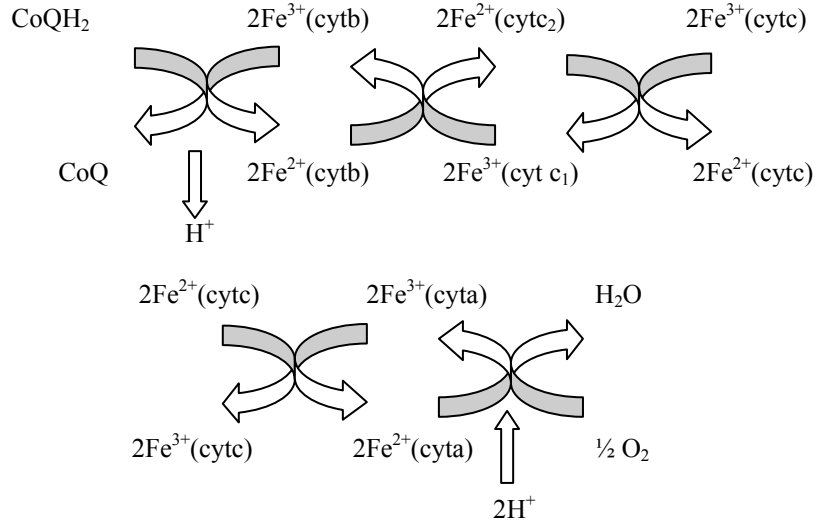


Koenzim Q (ubikinon), uzun bir izoprenoid kuyruğu olan bir kinon türevidir. Biyolojik sistemlerde çok yaygın olarak bulunduğu için ubikinon olarak da adlandırılır. Koenzim Q, hidrojenlerini hem NADH dehidrogenaz tarafından oluşturulmuş FMNH₂'den hem de süksinat dehidrogenaz tarafından oluşturulmuş FADH₂'den alabilir.

Kompleks III (sitokrom bc1 kompleks, ubinol-sitokrom c oksidoredüktaz): Sitokrom b, sitokrom c1 bir demir-sülfür kompleksinden oluşur. Her biri bir atom demir taşıyan porfirin halkasından oluşmuş bir hem grubu içerirler. Hemoglobinin hem grubundan farklı olarak sitokromların demir atomu, reversibl elektron taşıyıcı görevinin gereği olarak, reversibl olarak ferri (Fe⁺³) şeklinden ferro (Fe⁺²) şekline dönüşür. Bu dönüşüm sırasında sitokrom c indirgenir (44).

Kompleks IV (Sitokrom a+a₃ kompleksi, sitokrom c oksidaz): Kompleks IV, sitokrom a, sitokrom a₃ ve 2 adet bakır iyonundan oluşur. Bu reaksiyonda sitokrom c okside olurken açığa çıkan hidrojen iyonu ile O₂'den H₂O oluşması söz konusudur. Bu reaksiyon sırasında Fe⁺² de tekrar Fe⁺³ haline dönüşür (44).

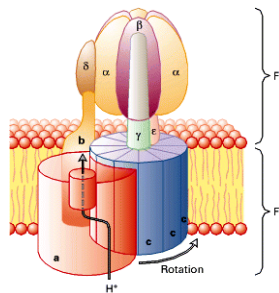
Elektronlar, elektron transport zincirinden geçerken büyük miktarda enerji serbestlenir. Bu enerji hidrojen iyonlarını, mitokondrinin iç matriksinden iç ve dış zarlar arasındaki dış boşluğa pompalanmak için kullanılır. Böylece bu boşlukta pozitif yüklü hidrojen iyon konsantrasyonu artarken iç matrikste kuvvetli bir negatif elektriksel yük yaratılmış olur.



Kompleks V (ATP sentetaz): Oksidatif fosforilasyondaki bundan sonraki aşama ADP'nin ATP'ye çevrilmesidir. Bu olay da mitokondrinin iç zarı boyunca yerleşik, başı bir düğme gibi iç matrikse doğru uzanan büyük bir protein olan ATP sentetaz enzimi ile gerçekleştirilir. Dış boşluktaki pozitif yüklü yüksek hidrojen iyon konsantrasyonu ile iç zarın iki tarafı arasındaki büyük elektriksel potansiyel farkı, hidrojen iyonlarının bu ATP sentetaz molekülü içinden mitokondri matriksine akışına neden olur. Bu olay sırasında hidrojen iyon akımından kaynaklanan enerji ATP sentetaz tarafından ADP'nin serbest iyonik fosfat kökü ile ADP'ye bağlanarak ATP'ye dönüşümünde kullanılır. Böylece molekül bir yüksek enerjili fosfat bağı daha kazanır. (Şekil 2.11).

Sürecin son aşaması mitokondri içindeki ATP'nin sitoplazmaya transferidir. Bu geçiş, iç zardan kolaylaştırılmış difüzyonla ve geçirgen olan mitokondri dış zarından da basit difüzyonla olur. ADP de, ATP'ye çevrilmek üzere sürekli olarak mitokondri matriksine transfer edilir (42-44).

Elektron transport zincirinden geçen her iki elektrona karşılık üç molekül ATP sentez edilir.



Şekil 2.10. ATPaz (Kompleks V'in yapısı)

2.3.4. Mitokondrilerde Oksidatif Stres ve Antioksidan Mekanizmalar

Oksijenle yaşayan tüm canlılarda, normal metabolizma sırasında serbest oksijen radikallerinin oluşumu, kaçınılmaz bir olaydır. Bu nedenle, mitokondrial elektron transport zinciri, mikrozomal sistem, fagositozda aktive olan peroksizomal enzimler ve diğer bazı sitozolik enzimler, serbest oksijen radikallerinin endojen oluşumuna aracılık ederler. Canlı organizmalar bu endojen ve ekzojen kaynaklı radikallere karşı biyolojik bütünlüklerini koruyabilmek için birçok savunma mekanizması geliştirmişlerdir. Bununla beraber, antioksidan savunma sistemleri ile serbest oksijen radikalleri arasındaki dengenin bozulmasıyla, aşırı miktarda üretilen serbest radikaller; enzimler ve diğer çeşitli proteinler, nükleik asitler, polisakkaritler ve zarlar üzerinde toksik etkiler oluşturarak, çeşitli hücre ve dokularda hasara neden olmaktadır. Serbest oksijen radikalleri proteinleri, lipidleri, karbonhidratları ve nükleik asitleri hasara uğrattırır. Serbest radikaller, doymamış yağ asitlerinde peroksidasyonu başlatarak, zar reseptörleri ile enzimlerin inaktivasyonuna yol açarak, polisakkarit depolimerizasyonu ve protein çaprazlaşmaları oluşturarak hücre zarlarında hasar meydana getirirler (46).

Ateroskleroz, hipertansiyon, iskemi-reperfüzyon hasarı, inflamasyon, kanser, tip II diabetes ile Parkinson ve Alzheimer Hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların patojenezindeki ortak sorun oksidatif hasardır. Ayrıca yaşlanma sürecinde de oksidatif hasarın önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (47).

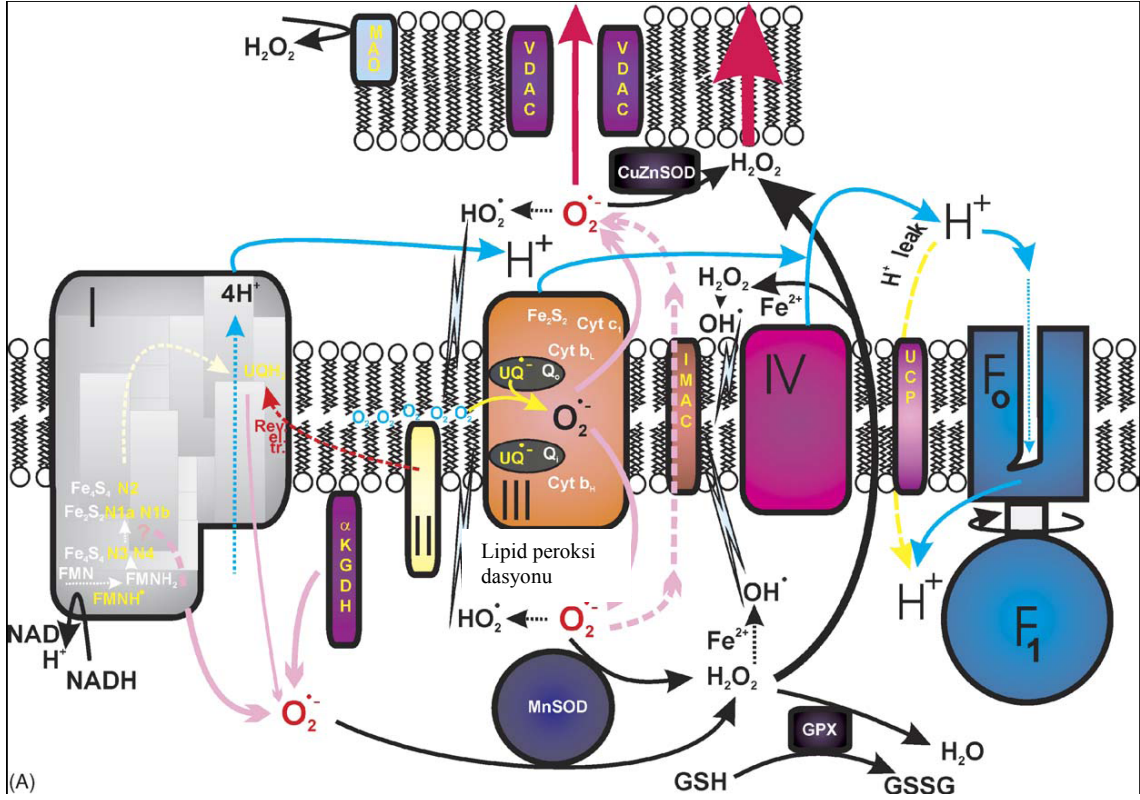
Reaktif oksijen ve nitrojen radikalleri tarafından gerçekleşen oksidatif hasarın en büyük kaynaklarından birisi de mitokondrilerdir. Elektron transport zinciri reaksiyonları sırasında sürekli serbest radikaller oluşur ancak bunlar, antioksidan savunma sistemine ait enzimler tarafından elimine edilirler. Bu enzimlerin başında ise süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gelir. Önemli olan, hücre ve/veya bütün vücudun serbest radikallere verdiği cevaptır. Mitokondri elektron transport zincirinde özellikle de süper oksit ($O_2^{\bullet-}$) anyonunun oluşumu kaçınılmazdır ve bu reaktifin başlıca kaynakları kompleks I ve kompleks III'tür. Kompleks I matrikse, kompleks III ise iç zarın her iki tarafına da $O_2^{\bullet-}$ salar. 2-oksoglutaraldehit dehidrogenaz ve diğer enzimler matrikse $O_2^{\bullet-}$ salımına eşlik eder. Açık olan IMAC kanalından matriks süper oksiti zarlar arası boşluğa geçebilir. $O_2^{\bullet-}$ 'nin %1'lik bir fraksiyonu H_2O^{\bullet} 'ya hidrate olur veya matriksteki MnSOD veya zarlar arası boşluktaki CuZnSOD ile H_2O_2 'ye dönüştürülür.

H_2O_2 ve OH^\bullet Her ikisi de oldukça reaktiftir. Proteinler ve DNA hasarının yanı sıra lipid peroksidasyonunu başlatırlar. H_2O_2 'nin çoğu GSH-Px tarafından yakalanır(47,48).

Serbest Oksijen Radikali Kaynağı Olarak Kompleks III

Kompleks III aktivitesi sırasında serbest radikallerin oluşumu Q siklusu esnasında gerçekleşir. Q siklusunda Q_0 ve Q_i olmak üzere iki bağlanma bölgesi vardır. Bunlardan Q_0 zarın sitozolik yüzeyinde, Q_i ise membranın matriks yüzeyinde yerleşmiştir. Kompleks III aktivitesi esnasında, ubikinolün (UQH_2) sitokrom c'ye aktarılması esnasında $UQO^{\bullet-}$ oluşur. Öncelikle, UQH_2 membran havuzundan iç membranın sitozolik yüzeyine yakın olan Q_0 bağlanma bölgesine difüze olur. İlk elektron, UQH_2 'den demir-sülfür kompleksi olan Rieske proteinine transfer edilir (ki bu elektron daha sonra sitokrom c1'e oradan da sitokrom c'ye aktarılır) ve bu işlem $2H^+$ iyonunun sitozolik tarafa salımına neden olurken Q_0 bölgesinde $UQ^{\bullet-}$ oluşumuna neden olur. Eğer bu $UQ^{\bullet-}$ membran içinde çözülmüş halde ulunan O_2 ile birleşirse $UQO^{\bullet-}$ oluşur ve normal şartlar altında $UQO^{\bullet-}$, sitokrom bL ile hemen UQ 'ya okside edilir. Bu durum özellikle de elektron transportunun yavaşladığı yüksek membran potansiyeli farkı durumunda görülür. Bu reaksiyon sonucunda $O_2^{\bullet-}$ oluşur (49). Muller ve ark. (50), kompleks III aracılığı ile oluşan bu $O_2^{\bullet-}$ 'nin yaklaşık yarısının negatif membran potansiyeli nedeniyle matrikse geçtiğini göstermiştir.

Q siklusunun diğer fazında ise; ikinci elektron, sitokrom b_L 'nin hem grubundan sitokrom b_H 'nin hem grubuna aktarılır. Bu iki b hem grubu arasındaki zar boyunca geçiş, yüksek membran potansiyeli farkında Q_0 fazındaki $UQ^{\bullet-}$ görülme süresinin uzamasındaki temel nedenlerden biridir. Bu nedenle de yüksek potansiyel farkında $O_2^{\bullet-}$ oluşumunun artması kaçınılmazdır. Sitokrom b_H hem grubu matriks yüzeyine yakın olarak yerleşmiş Q_i bağlanma bölgesinin yanındadır. Sitokrom b_H UQ 'ya bir elektron vererek $UQ^{\bullet-}$ oluşmasına neden olur. İkinci UQH_2 molekülü Q_0 bölgesinde okside olurken, ikinci elektron Q_i bölgesinde $UQ^{\bullet-}$ molekülünü UQH_2 'ye indirger ve UQH_2 havuza geri döner. Q_i bölgesi $UQ^{\bullet-}$ molekülünü sıkıca bağlar ve kararlı hale getirir. Bu durumda $UQ^{\bullet-}$ molekülü Q_i bölgesinde O_2 ile etkileşemez. Bu nedenle Q_0 bölgesi $UQ^{\bullet-}$ oluşumuna neden olurken, Q_i bölgesi $UQ^{\bullet-}$ molekülünü kararlı hale getirerek yağda çözülmüş oksijenle birleşerek $UQO^{\bullet-}$ oluşturmaya engel olur (Şekil 2.11) (47,49).



Şekil 2.11. Mitokondri iç zarında oksidan ve antioksidan mekanizmalar

Serbest Oksijen Radikali Kaynağı Olarak Kompleks I

Kompleks I tarafından oluşan $O_2^{\bullet-}$ 'nin hepsi matrikse salınır ve bu $O_2^{\bullet-}$ matrikse derhal MnSOD tarafından yakalanır. Kompleks I çok büyük bir molekül olduğu için kompleks III'teki gibi $O_2^{\bullet-}$ kaynağı olan bölgeler ve mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Kompleks I'in demir-sülfür bağlı bölgelerinde zar potansiyel farkı yükseldiğinde, diğer bir deyişle elektron transportu yavaşladığında $O_2^{\bullet-}$ üretiminin artacağı düşünülebilir. Bunun aksine, zar potansiyel farkının düşürülmesi UQ havuzunun okside olma eğilimini artıracak ve kompleks I'e elektron desteği artacak ve böylece $O_2^{\bullet-}$ üretimi azalacaktır (47).

Mitokondrilerdeki Diğer Serbest Oksijen Radikali Kaynakları

Süksinat Dehidrogenaz (Kompleks II) gibi mitokondrial dehidrogenazların da serbest oksijen radikali kaynağı olduğu düşünülmektedir. Kompleks II elektron transfer partneri bulamadığında flavin semikuinon radikalının redükte flavin ile reaksiyona girmesi durumunda ancak süperoksit radikali oluşumuna neden olur. Bu da ancak oksidatif hasar veya hipoksi durumlarında görülen bir olaydır. Diğer flavoprotein enzimlerin

aktivitesi sırasında da redükte flavinler serbest oksijen radikali oluşumuna neden olabilir.

Ayrıca zara gömülü olan 3-fosfoglisero1 dehidrogenaz da $O_2^{\bullet-}$ üretimine neden olmaktadır. Monoaminoksidaz izoenzimleri de biyolojik aminleri okside ederek H_2O_2 oluşumuna neden olur. Bunun yanı sıra apoptoz başlatıcı faktör de NADH oksidaz enzim aktivitesini artırmak suretiyle $O_2^{\bullet-}$ üretimini artırmaktadır (48).

Reaktif Oksijen Partiküllerinin Mitokondrial ve Ekstramitokondrial Yollarla Detoksifikasyonu

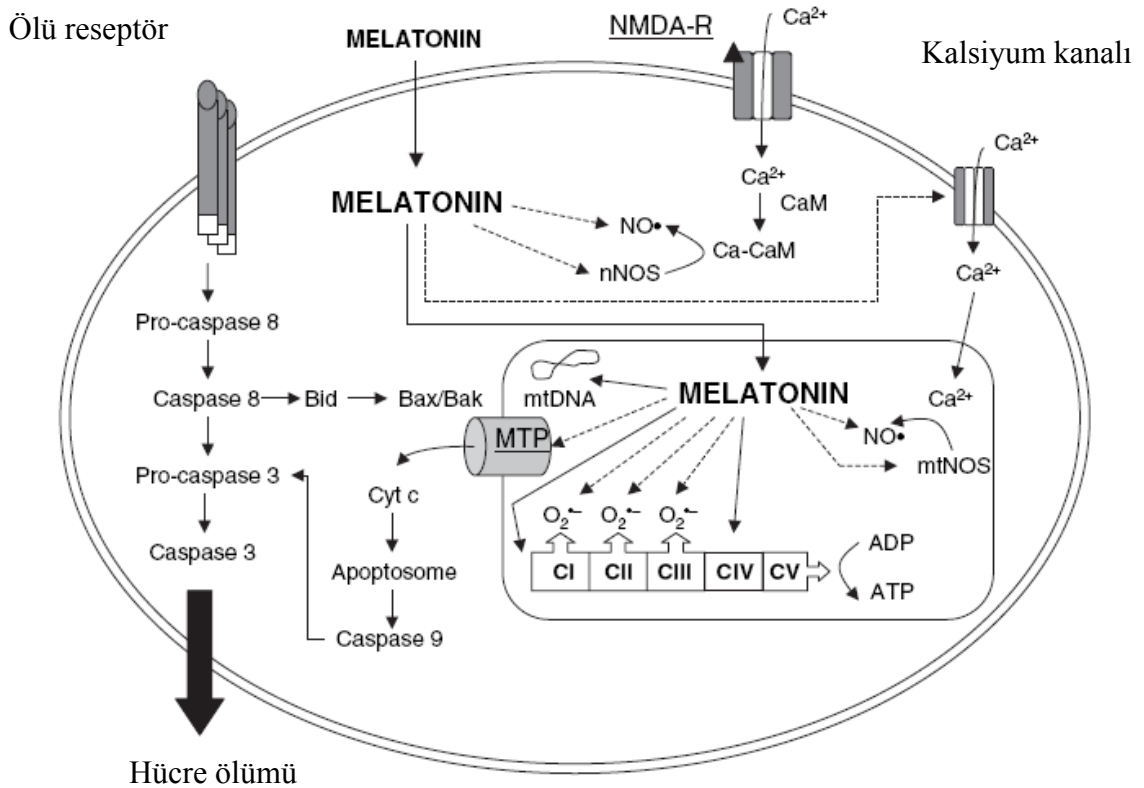
Matrikste oluşan $O_2^{\bullet-}$ MnSOD ile, zarlar arası bölgeye geçen $O_2^{\bullet-}$ ise buradaki CuZnSOD ile H_2O_2 'ye dönüştürülür. Sitozole geçen $O_2^{\bullet-}$ ise sitozolik CuZnSOD ile, hücre dışına çıkan $O_2^{\bullet-}$ ise ekstraselüler CuZnSOD ile H_2O_2 'ye dönüştürülür (47-50).

Bu nedenle Kompleks III aracılığı ile oluşan oksidatif hasarda Q siklusunda iki önemli antioksidan savunma sistemi rol oynar. Bunlardan Q_0 zarlar arası boşluğa yakın olması nedeniyle, bu molekülün aktivasyonu esnasında oluşan $O_2^{\bullet-}$ zarlar arası boşluğa geçer ve burada CuZnSOD ile detoksifiye edilir (51). Ancak bu bölgede yeterli antioksidan savunma sağlanamazsa bu $O_2^{\bullet-}$ radikalleri voltaj kapılı kanallar aracılığı ile sitozole geçebilirler. Bu durumda ise sitozolde bulunan CuZnSOD enzimi detoksifikasyondan sorumludur (52). Q döngüsünün Q_i komponenti aracılığı ile oluşan $O_2^{\bullet-}$ ise matrikste MnSOD ile H_2O_2 'ye dönüştürülür. H_2O_2 ise özellikle de Fe^{+2} gibi geçiş elementlerinin Fenton reaksiyonu sonucu $\bullet OH$ radikaline dönüşür. $\bullet OH$ biyolojik moleküllerle etkileşebilen oldukça reaktif bir moleküldür. Glutatyon S transferaz, peroksiredoksinler gibi tioredoksin grupları gibi glutatyon temelli sistemler sitozoldeki temel redoks sistemleridir. $\bullet OH$ ve diğer reaktif oksijen partikülleri selenyum içeren bu redoks sistemleri tarafından detoksifiye edilir. H_2O_2 'nin ortamdaki uzaklaştırılmasında en önemli mekanizmalardan birisi de GSH-Px enzimidir (Şekil 2.11).

Mitokondrilerdeki önemli antioksidanlardan birisi de koenzim Q'dur. Koenzim Q kısmen indirgenmiş formunda bulunursa serbest oksijen radikali kaynağı olarak, tam indirgenmiş formda bulunursa antioksidan olarak etki gösterir (53).

Mitokondrilerde reaktif oksijen moleküllerini engellemenin diğer bir yolu ise, membran potansiyelidir. Membran potansiyeli farkı yüksek olursa, reaktif oksijen partiküllerinin sentezi artar. Ancak bu potansiyel farkını düşürme mekanizmaları henüz tam olarak

Mitokondri zarının permeabilitesinin bozulmasına bağlı hücre ölümünde matrikse normalden fazla bir Ca^{+2} akışı söz konusudur. Bunu takiben, mitokondrial permeabilite geçişi (mitochondrial permeability transition; MPT) adı verilen teoriye göre, mitokondri iç zarında bulunan mega kanallar açılarak <1500 Dalton olan molekülleri geçirmeye başlar. Bu durumda ATP sentezlenmesi yerine hidrolizi ve yıkımı söz konusu olur. Ayrıca mitokondri matriksindeki iyonlar da bu kanaldan sitozole geçebilir ve hücre nekroze olabilir. İkinci mekanizmaya göre ise; sitokrom c zarlar arası boşluktan sitozole geçer ve burada Apaf-1 adı verilen diğer bir faktöre bağlanır. ATP varlığında bu kompleks apoptozom adı verilen diğer bir kompleksi polimerize eder. Bu kompleks de apoptozun önemli proteazlarından olan caspase-9 ve caspase-3'ü aktive eder. Proteolitik reaksiyonlar kaskadı DNAaz'ları aktive eder ve sonuçta hücre ölümü gerçekleşir. Bu nedenle hücre permeabilitesinin korunması hücre ölümü açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle melatoninin zarın stabilitesini artırması nedeniyle de mitokondri zarının permeabilitesinin bozulmasına bağlı apoptozisi önlediği düşünülmektedir (Şekil 2.13) (62,63).



Şekil 2.13. Melatoninin mitokondriyel aracılı apoptozisin önlenmesindeki önemi.

Melatoninin mitokondrilerde iki önemli etkisi vardır. Bunlardan biri indolamin yapısının antioksidan özelliğinden kaynaklanan koruyucu etkisidir. Bu etki hem serbest radikalleri yakalaması hem de antioksidan enzim aktivitelerini artırmasından kaynaklanır. İkinci etkisi ise; ETZ komplekslerinin aktivitelerini artırarak, patolojik durumlarda mitokondrilerin fonksiyonunu idame ettirebilmesine yardımcı olması ve ATP sentezini artırmasıdır (64).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda ve Balearic Islands Üniversitesi, Biyoloji Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Deneylede Real-time PCR (Roche Light Cycler), kinetik ölçüm yapabilen çok amaçlı ELISA cihazı (BioTek Ins., UT, USA), ELISA okuyucusu, elektroforez, spektrofotometre (Helios beta), soğutmalı santrifüj (Hettich), hassas terazi (Bosch S2000), pHmetre (Sartorius), su banyosu (Memmert), etüv (Dedeoğlu), manyetik karıştırıcı (Nüve), vortex (Elektromag), homojenizatör ve diğler laboratuvar malzemeleri kullanıldı.

Kullanılan cam malzemelerin tümü deiyonize su ile yıkanıp bir gün %20 HNO₃ çözeltilisinde bekletildikten sonra, üç kez deiyonize sudan geçirilerek demineralize edildi. Deneylede kullanılan çözelti ve tamponlar deiyonize su ile hazırlandı.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler gerekli ortam sıcaklıklarında saklandı.

3.1. DENEY GRUPLARI

Deneylede; Erciyes Üniversitesi Deneysel Klinik Araştırma Merkezi'nden sağlanan Swiss Albino 90-120 günlük, ortalama 200-250 gr ağırlığında, 50 erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Deneyle süresince, normal oda sıcaklığı ve neminde tutulan sıçanlar,

standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi. Sıçanlar 10'arlı 5 gruba ayrılarak havalandırması ve ışıklandırması ayarlanabilen sirkadiyen ritim çalışmaları için özel olarak tasarlanmış olan kafeslerde bir hafta süreyle farklı aydınlık-karanlık (A-K) döngülerine tabi tutuldu. Gruplara uygulanan aydınlık/karanlık döngüleri:

1. Kontrol : 12/12 saat A/K döngüsü uygulanan grup
2. Grup : 0/24 saat A/K döngüsü uygulanan grup
3. Grup : 8/16 saat A/K döngüsü uygulanan grup
4. Grup : 16/8 saat A/K döngüsü uygulanan grup
5. Grup : 24/0 saat A/K döngüsü uygulanan grup

Gruplardaki bütün sıçanlar bir haftalık sürenin sonunda içinde buldukları sirkadiyen ritmin gerektirdiği ışık ortamında her sabah saat 10:00'da 40mg/kg ketamin ile anestezi edildikten sonra abdominal aortadan bütün kanlarının heparinli enjektöre çekilmesi suretiyle öldürüldü. Sıçanlardan kan alımı işlemi takiben kafatası insizyonla açıldı ve pineal bezleri, beyinleri ve gözleri çıkartıldı. Pineal bez örnekleri hızlı bir şekilde doku RNAaz enzim inhibitörü içeren serum fizyolojik çözeltilisine konularak -80°C 'de saklandı. Çıkarılan beyin ve göz örnekleri mitokondri izolasyonu için hazırlanmış homojenizasyon çözeltilisine alınarak homojenize edilerek, izolasyon işlemine geçildi. Elde edilen mitokondri çözeltileri de ölçümlere kadar -80°C 'de saklandı.

Sıçanlardan alınan heparinli tam kan örnekleri; 3 kez fosfat tamponu ile (PBS) yıkanmak ve santrifüj edilmek suretiyle, eritrosit paketi ve plazma olmak üzere ayrılıp plazma melatonin düzeyleri ve antioksidan enzim aktivitesi ölçümleri için -20°C 'de derin dondurucuda saklandı.

3.2. PLAZMA MELATONİN DÜZEYİNİN ÖLÇÜLMESİ

Plazma Melatonin düzeyi Melatonin ELISA kiti (IBL, Turkey) ile ölçüldü. Testin prensibi, biotinlenmiş ve biotinlenmemiş antijenlerin belli miktarda antibadi bağlanma bölgesine kompetatif bağlanma derecelerinin ölçülmesi esasına dayanır. Biotinlenmiş antijen bağlanması örnekteki analit konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

Plazma örneklerinden melatoninin ekstraksiyonu özel olarak hazırlanmış ekstraksiyon kolonları (Waters) ile gerçekleştirildi. Sistem dengeye geldiğinde, serbest biotinlenmiş antijenler ortamdan uzaklaştırılarak p-nitrofenil fosfat substratı varlığında antibadilere

bağlı olan biotinlenmiş antijenlerin miktarı anti-biotin alkalın fosfataz belirteci ile belirlenirken, miktar tayini ise konsantrasyonu bilinen aynı şekilde çalışılmış standart eğriden hesaplandı ve pg/ml cinsinden ifade edildi (65,66).

3.3. MELATONİN RESEPTÖR EKSPRESYONUNUN ÖLÇÜLMESİ

Melatonin reseptörlerinden MT1 ve MT2 reseptörlerinin ekspresyonları, SYBR Green I floresan boyasının DNA çift sarmalına bağlanarak floresan ışımaya vermesi esasına dayanan yöntemle, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Real-Time PCR; Gerçek zamanlı PZR) cihazı (Roche; Light Cycler) ile tayin edildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR; PCR) Tekniği

PZR tekniği ilk kez Kary Mullis tarafından 1985' te bulunmuş ve 1993 yılında bu çalışma ile Nobel ödülü kazanmıştır (67). Bu yöntemde DNA (deoksiribo nükleik asit) zincirinin önceden belirlenen bir bölgesini çoğaltmak için kullanılan, moleküler genetik alanında devrim niteliği taşıyan bir tekniktir. PZR uygulamaları için ilgili gen bölgesine ait baz dizisinin bilinmesi gereklidir. Metot basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. Bu yöntemle RNA (ribo nükleik asit) çoğaltılmak istenirse bunun önce revers transkriptaz kullanılarak DNA kopyası çıkarılır ve PZR ile bu DNA molekülü çoğaltılır. Bu çalışmada, MT1 ve MT2 reseptörlerine ait genlerin mRNA düzeyleri gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu ile kantitatif olarak ölçüldü.

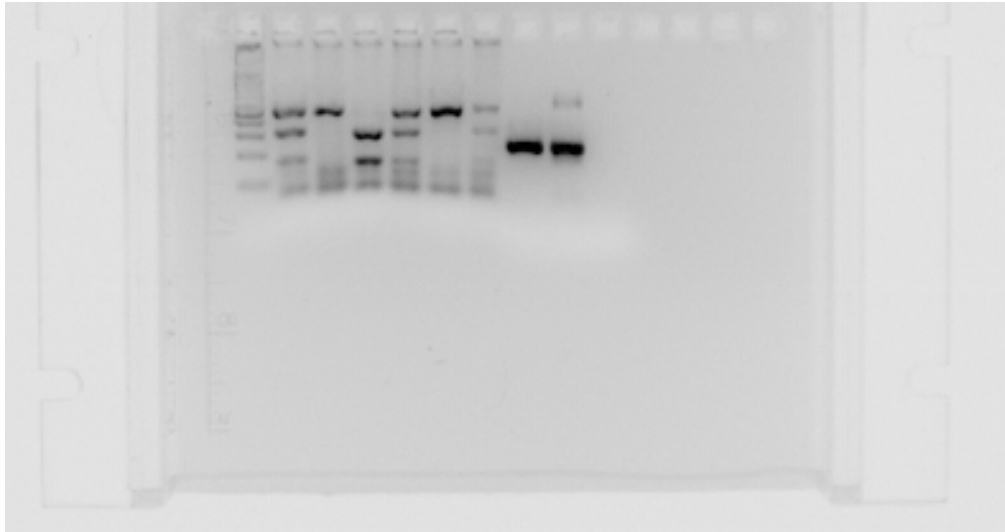
İşlem 4 aşamada gerçekleştirildi:

1. RNA Ekstraksiyonu: RNAaz inhibitörü içeren serum fizyolojik içinde ölçümlere kadar -80°C 'de bekletilen pineal bez dokusu, 500 μl Tripure çözeltisi içine alınarak homojenize edildi. 12000g'de 4°C 'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen üç fazlı çözeltide RNA içeren orta faz alındı. 5dk buz banyosunda bekletildikten sonra üzerine 200 μl kloroform eklendi ve 15 sn vortekslendi. 12000g'de 4°C 'de 15 dk santrifüj edildi. Oluşan üç fazlı sistemde RNA içeren en üst faz alındı. Üzerine 500 μl izopropanol eklendi. Elde çalkalandı ve bu formu gece boyunca -20°C 'de bekletildi. 12000g'de 4°C 'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine 1 ml etanol eklenerek, 7500g'de 4°C 'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet kuruluğa kadar savantta kurutuldu. RNAaz içermeyen su ile daha önce hesaplanmış miktarlarda resüspand edildi. 65°C 'de 15 dk bekletildi. 260 ve 280nm'de spektrofotometrede miktar ve saflık tayini yapıldı (68).

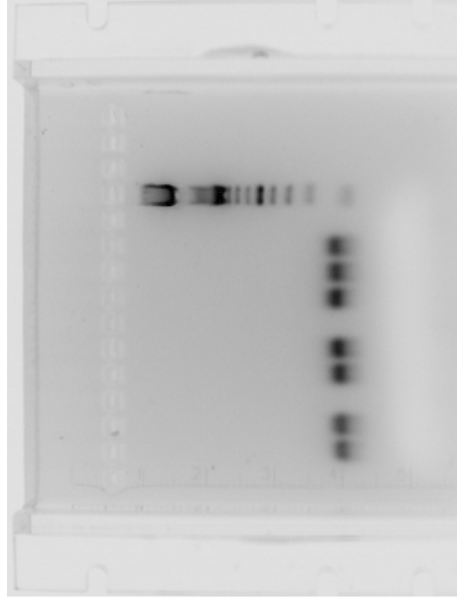
2. RNA'dan cDNA elde edilmesi: PZR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleşir. Bu işlem için amaca yönelik olarak hazırlanmış otomatize sistemlerden (Thermal Cycler) yararlanıldı.

İlk basamakta, 90  C'de 1dk süreyle denatüre edilerek DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılması sağlandı. Daha sonra üzerine 1:1 oranında revers transkriptaz eklendi ve Thermal Cycler cihazında 42  C'de 60 dk ve 95  C'de 5 dk bekletilmek suretiyle cDNA'sı elde edildi. Elde edilen bu cDNA 1/10 oranında dilüe edilerek MT1 ve MT2 reseptörleri için gerçek zamanlı PZR cihazı ile mRNA ekspresyonlarına bakıldı (68).

3. Agaroz jel: Çoğaltılan ve gerçek zamanlı PZR cihazında kantitatif tayini yapılacak olan cDNA'nın MT1 ve MT2 reseptörlerine ait olup olmadığının tespit edilmesi için proteinleri ağırlıklarına göre ayırma yapan agaroz jel elektroforezi yapıldı. Elektroforez ile boylarına göre ayrıştırılan DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışığı altında floresans vererek görünür hale getirildi. Elektroforez'de PZR rnlerinin büyüklüğü daha önceden bilinen DNA molekülleri ile karşılaştırılarak belirlendi. Reaksiyonun özgüllüğü çok iyi tanımlanmış primer oligonükleotidlerin seçilmesiyle sağlandı (şekil 3.1, şekil 3.2).



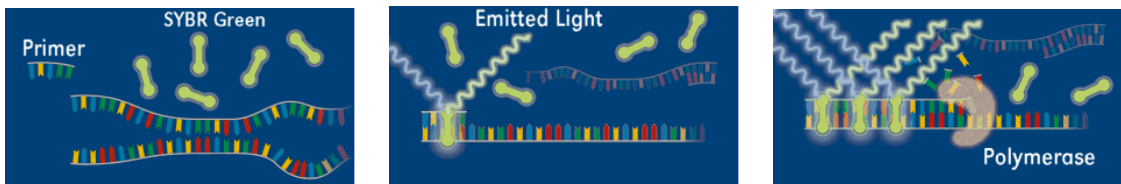
şekil 3.1. MT1 reseptörü için agaroz jel elektroforezi sonuçları



Şekil 3.2. MT2 reseptörü için agaroz jel elektroforezi sonuçları

4. Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR) ile Kantitatif Tayin:

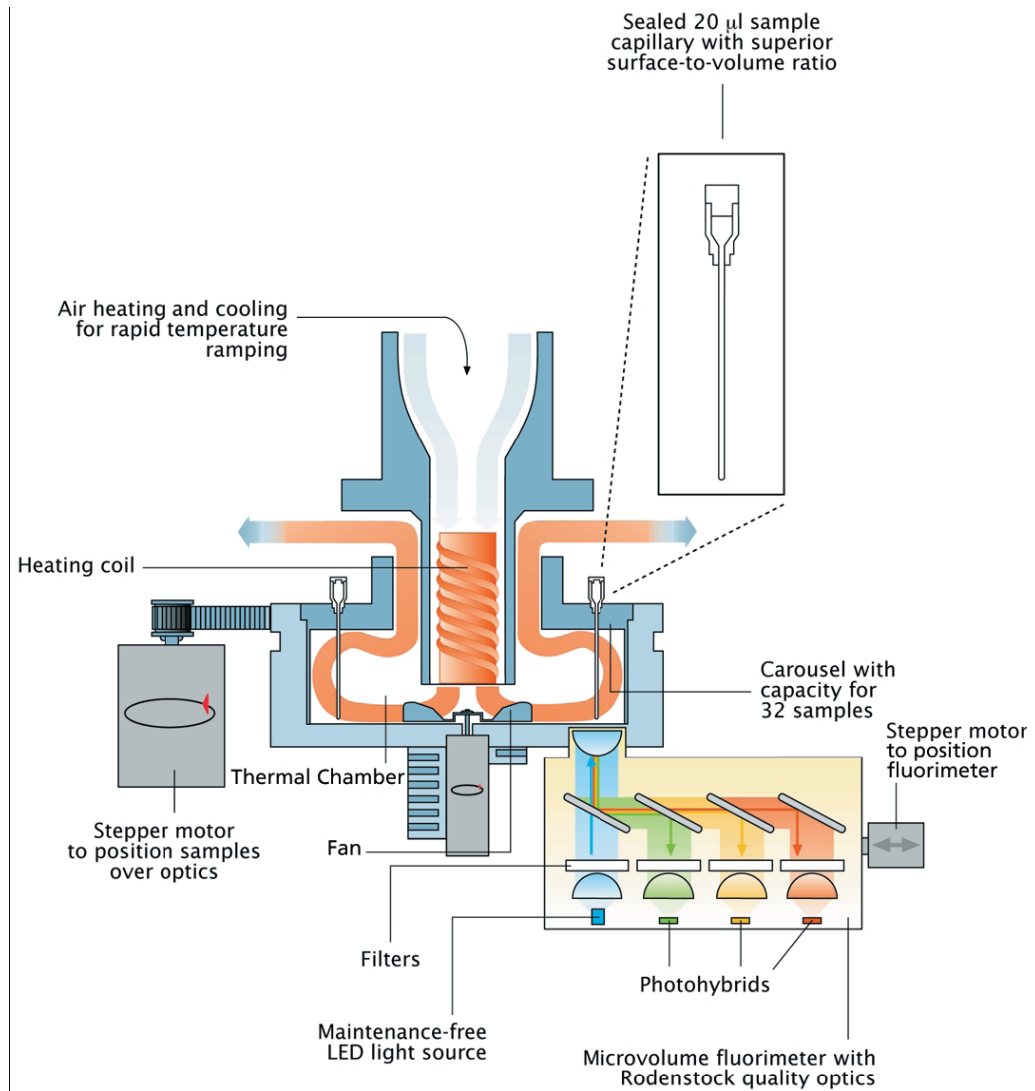
Gerçek Zamanlı PZR sistemi, floresan boyalar ya da proplar kullanılarak PCR ürününün reaksiyon sırasında görüntülenmesine olanak verir. Ürünün çoğalımı floresan sinyalin artışına neden olduğundan, her döngüde artan DNA miktarı reaksiyon süresince hassas olarak ölçülür. Bu çalışmada gerçek zamanlı PZR reaksiyonlarında interkalatör boya yöntemi kullanıldı ve 4 aşamada gerçekleştirildi. Bunlardan ilki **inkübasyon** adı verilen **denatürasyon** süresi, ikincisi **döngü (siklus)** adı verilen üç basamaklı **amplifikasyon** süresi, üçüncüsü ise **Tm** adı verilen **erime noktasının tayini** ve son olarak da **soğutma süresidir** (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Gerçek zamanlı PZR sisteminde SYBR Green I boyası ile interkalatör boya yöntemi esasının şematik gösterimi.

Gerçek zamanlı PZR ile cDNA'nın çoğaltılabilmesi için tepkime karışımına; çoğaltılacak olan kalıp cDNA, bu cDNA'da çoğaltılması planlanan bölgedeki cDNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan primerler, enzim olarak Taq polimeraz, sentezde kullanılacak deoksिनükleotid trifosfatlar (dNTP), magnezyum klorür ($MgCl_2$),

polimerazın çalışması için tampon görevi yapacak maddeler ve özgül olmayan floresan işaretli problardan olan Syber Green I floresan boyası, laminar flow altında daha önceden ultraviyole ışık altında sterilize edilmiş malzemeler kullanılarak 4°C’de eklendi. Karışım, gerçek zamanlı PZR için özel olarak tasarlanmış geniş yüzey alanına sahip 1.5mm dış çapa sahip, 3 cm uzunluğundaki kapillerlerde hazırlandı ve gerçek zamanlı PZR’de her bir reseptör için aşağıdaki protokoller uygulandı (Şekil 3.4) (69,70).



Şekil 3.4. Gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu sistemi şematik gösterimi

4.a. MT1 Reseptörü mRNA ekspresyonu tayini için kullanılan gerçek zamanlı PZR protokolü:

MT1 reseptörü için amplicon uzunluğu 122pb baz çifti olup, kodlayıcı primerin baz dizilimi: 5'- ACTGGAAGGCCAATACAGTTGA, kalıp primerin baz dizilimi: 5'-

ATGTTTCGCAGTGTGGTTT şeklindedir. MT1 reseptörüne ait mRNA'dan elde edilen cDNA'ya ait gerçek zamanlı PZR'de aşağıdaki protokol uygulandı.

İnkübasyon : 95°C'de 600 sn (denatürasyon; DNA çift sarmalının ayrılması)

Döngü : 95°C'de 10 sn (denatürasyon, DNA çift sarmalının ayrılması)

58°C'de 10 sn (birleşme, annealing, primerlerin DNA'daki hedef bölgelerle özgül hibridizasyonuna olanak verecek sıcaklıkta birleşmesi)

72°C'de 7 sn (polimerizasyon, sentez; primerlere bağlanmış olan enzim moleküllerinin 3' ucuna kalıp DNA'ya uygun nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi yapması).

Bu üç basamak bir döngüyü oluştururken, her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olup ve n döngüde 2^n sayıda amplifikasyon ürünü elde edildi.

Erime noktası tayini: 95°C'de 5 sn, 65°C'de 180 sn, 99°C'de 1 sn (Primerlerin ayrılmış DNA zincirleri üzerinde (tamamlayıcı) komplementer oldukları bölgelere eşleşip kalıp DNA zinciri ile primer arasında hidrojen bağlarının oluşmasının sağlanacağı bir sıcaklık derecesi vardır. T_m (erime noktası) adını alan bu sıcaklık derecesi primer dizisinin baz içeriğine göre değişir. Primerdeki G ve C sayısı arttıkça T_m derecesi de artar. $T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T)$)

Soğutma süresi : 95°C'de 1 sn, 40°C'de 20 sn

4.b. MT2 Reseptörü mRNA ekspresyonu tayini için kullanılan gerçek zamanlı PZR protokolü:

MT2 reseptörü için ampikon uzunluğu 64pb baz çifti olup, forward primerin baz dizilimi: 5'-GGCGGGGAGGAAATAAGA, revers primerin baz dizilimi ise: 5'-GTTGCGATACACAGACAGGA şeklindedir. MT2 reseptörüne ait mRNA'dan elde edilen cDNA'ya ait gerçek zamanlı PZR'de aşağıdaki protokol uygulandı.

İnkübasyon : 95°C'de 600 sn (denatürasyon)

Döngü : 95°C'de 10 sn (denatürasyon)

68°C'de 10 sn (birleşme, annealing)

72°C'de 7 sn (polimerizasyon, sentez).

Erime noktası tayini: 95°C’de 5 sn, 65°C’de 180 sn, 99°C’de 1 sn

Soğutma süresi : 95°C’de 1 sn, 40°C’de 20 sn

SYBR Green I Boyası ile DNA Tayini

Floresan boya SYBR Green I DNA çift sarmalına bağlanma özelliğine sahiptir. Amplifikasyon işleminin başlangıcında reaksiyon karışımı olarak denature DNA, primerler ve SYBR Green I boyası kullanıldı. Yöntemin esası:

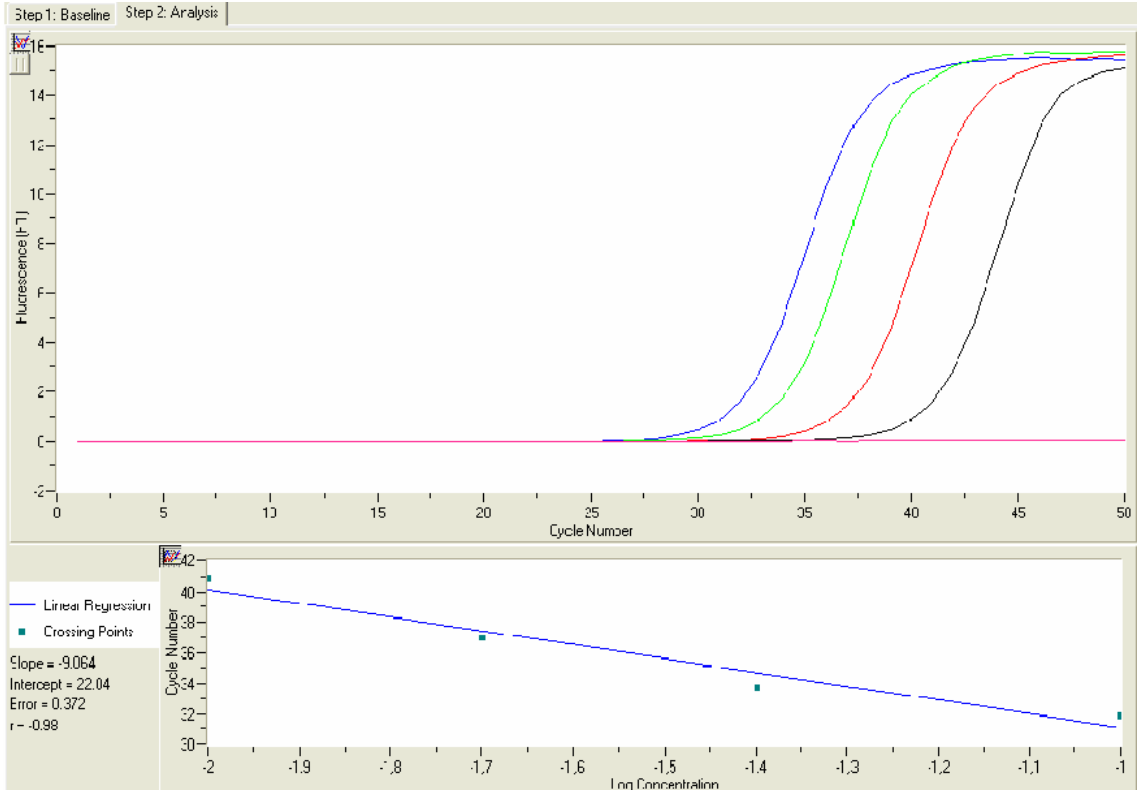
Polimeaz zincir reaksiyonu esnasında ilk aşama, DNA çift sarmalının ayrılmasıdır. Daha sonra Syber Green I boyası bu DNA sarmalına bağlanır. Ekspresyonu tayin edilmek istenilen reseptörün genetik şifresini içeren DNA koduna karşılık gelen primer ortama eklendiğinde primerler “annealing; bağlanma” adı verilen işlemle DNA çift sarmalı oluşturmaya başlar ve primerlerin bağlanma aşamasından sonra, DNA’ya bağlanmış olan SYBR Green I molekülleri eksitasyonla floresan ışın yaymaya başlar.

Zincirin uzaması esnasında, yeni sentezlenen DNA sarmalına daha çok SYBR Green I molekülü bağlanır ve artan floresan zamana bağlı olarak kantitatif şekilde kaydedilir. Her bir PCR siklusunun uzama basamağının sonundaki floresan ölçümü artan amplifiye DNA’nın miktarını monitorize eder.

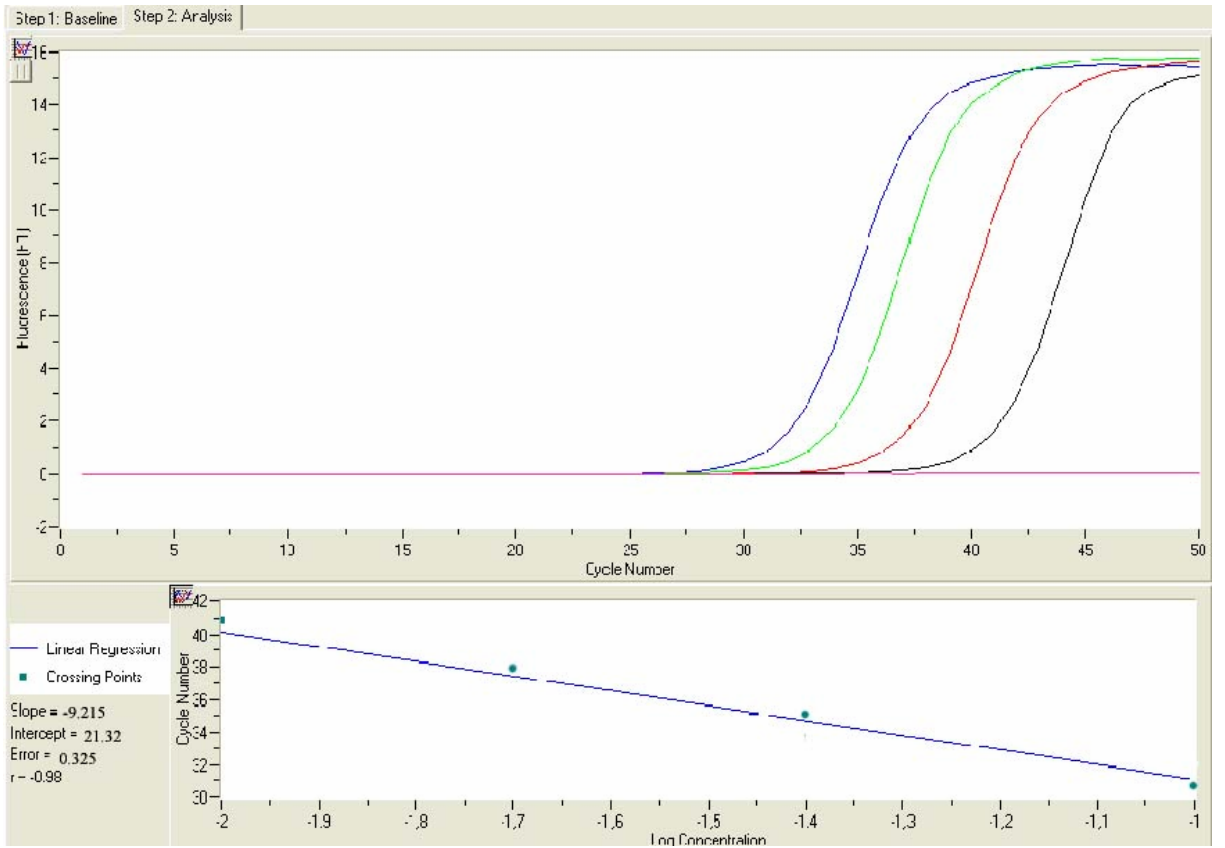
Çalışmada housekeeping gen olarak ise; 18 S ve β -Actin ekspresyon seviyesi internal kontrolü olarak kullanıldı. Kullanılan 18 S kodlayıcı primer 5’-GAG GTG AAA TTC TTG GAC CGG-3’; kalıp primeri ise 5’-CGA ACC TCC GAC TTT CGT TCT-3’ dizilimlidir. β -Actin için kodlayıcı primer 5’- GTG GTG TGT GAA GCT GTA GCC-3’, kalıp primer ise 5’- ACG GGC AAT GTG ATG GAC TC-3’ şeklindedir.

“Light Cycler” Sisteminde ayrıca erime noktası tayini ve cDNA sentezi kantitatif analizleri software aracılığı ile gerçekleştirildi. Sentezin gerçekleşebilmesi için bu değer ön denemelerle belirlendi.

“Light Cycler” Sistemi software’i aracılığı ile kantitatif analizde, analizin log-lineer fazı üzerinden hesaplamalar yapıldı. Farklı dilüsyonlarda hazırlanmış konsantrasyonu bilinen DNA ürünleri ile hazırlanan standart eğrilerin verdiği kantifikasyon eğrileri üzerinden “İkinci Türevin Maksimumu” metodu ile miktar tayini yapıldı. Bu metot, floresansın en fazla olduğu siklus numarasını (Crossing Point) otomatik olarak hesaplayan bir metottur. Bu nokta aynı zamanda floresansın en hızlı olduğu noktadır (Şekil 3.5, 3.6) (69,70).



Şekil 3.5. MT1 reseptörüne ait standart eğri



Şekil 3.6. MT2 reseptörüne ait standart eğri

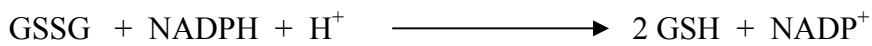
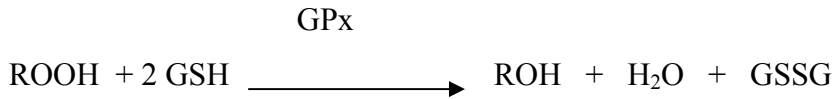
3.4. MİTOKONDİRİ İZOLASYONU

6ml/g beyin dokusu ve göz dokusu izolasyon mediumu olarak hazırlanan STE (Sukroz, Tris ve EGTA solüsyonu; pH:7.4; 4°C; 250 mM Sükroz, 5 mM Tris, 2 mM EGTA) solüsyonu içinde ayrı ayrı homojenize edildi. Homojenizatör yaklaşık 10 kez sabit zaman aralıkları ile hareket ettirilerek hazırlanan homojenat, 2000 g'de 8 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar alındı ve 12000g'de 10 dk tekrar santrifüj edildikten sonra pellet daha sonra yapılacak deneyin amacına göre resüpsansiyon solüsyonu (pH:7.4; 4°C; 140 mM KCl, 20 mM Tris HCl) içinde resüspand edilerek ölçümlere kadar -80°C'de saklandı (59, 71, 72).

3.5. MİTOKONDİRİLERDE GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ TAYİNİ

Mitokondrilerde glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi birleşik enzimatik yöntem kullanılarak tayin edildi (73).

Metodun prensibi, GSH'ın H₂O₂ ile oksitlenmesini katalizleyen GSH-Px reaksiyon hızının, GSSG-Rd reaksiyonu sırasında tüketilen NADPH konsantrasyonu üzerinden ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Reaksiyon ortamına ekzojen olarak eklenen NADPH ve GSSG-Rd ile okside glutatyon derhal GSH şekline dönüştürülerek ortamda GSH konsantrasyonu sabit tutulmaktadır. Reaksiyon karışımındaki NADPH'ın NADP⁺'ye dönüşmesi esnasında 340 nm'de, optik dansite (OD)'deki düşüş izlenerek GSSG oluşum hızı ölçülmek suretiyle enzim aktivitesi ölçüldü.



ROOH: Tert-butil hidroperoksit (R= C (CH₃)₃)

GSH: Redükte Glutatyon

GPx: Glutatyon Peroksidaz

GSSG: Okside Glutatyon

GRd: Glutasyon redüktaz

Reaktifler:

Reaksiyon tamponu:

- 50 mM Tris HCl (T-3253) pH= 7,6 (1N KOH ile ayarlandı)
- 5 mM EDTA (E-0270)
- 1 mM GSH (G-6529)
- 0.22 mM β -NADPH(N-1630)
- 0.4 U/ml GRd (G-3664)

Tert-Butyl Hidroperoksid'in hazırlanışı (B-2633)

- Her bir küvette son konsantrasyon, 0,22 mM ROOH olacak şekilde ayarlandı.

Enzimatik tayin:

950 μ l Reaksiyon tamponu + 10 μ l örnek küvete kondu. Üzerine 40 μ l ROOH eklendi ve 340 nm'de 37 °C'de 3 dk boyunca aktivite izlendi.

Aktivite Tayini:

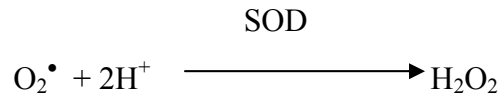
Aktivite= nmol NADPH okside / dk= 1mU GPx

NADPH ϵ = 6.22 cm² / μ mol

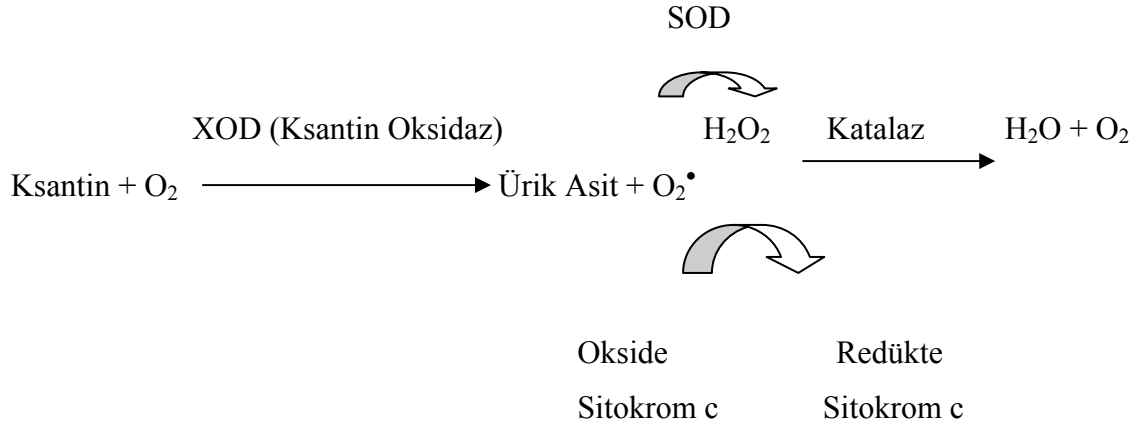
Aktivite (nmol/dk .ml) = mA/dk . 1000/6.22 formülleri ile hesaplandı.

3.6. MİTOKONDRİLERDE Mn-SOD AKTİVİTESİ TAYİNİ

Mn-SOD mitokondri matriksinde bulunan SOD enzimi izoformudur ve ROS'lara karşı enzimatik antioksidan savunma sisteminde ilk sırada yer alır. Mitokondrial solunum zincirinde oluşan süper oksit anyonlarını yakalamak suretiyle antioksidan etkisini gerçekleştirir. Mn-SOD tarafından katalizlenen reaksiyon şu şekildedir:



Süperoksit anyonu oldukça aktif bir reaktiftir ve sitokrom c'yi indükleyebilir. Bu tayin yöntemi, bu reaksiyonlar zincirinde indirgenen sitokrom c miktarı tayini esasına dayanır (74). Tayin sırasında gerçekleşen reaksiyonlar zinciri şu şekildedir:



Ksantin oksidaz enzimi aracılığı ile oluşan süperoksit anyonu, mitokondride sitokrom c'yi indirgeyebilir. Ancak SOD varlığında oluşan süperoksit radikali SOD tarafından yakalanacağından, oluşan redükte sitokrom c miktarı kompetatif bir şekilde azalacaktır.

Stok Reaktifler:

1. PBS, pH= 7.4
2. Sitokrom c 1.95 mM
3. Süperoksit Dismutaz 10200 U/ml
4. Katalaz 6000 U /ml
5. Ksantin Oksidaz 335 mU/ml (Ölçüm anında hazırlandı)
6. Ksantin 10mM: 30 mM NaOH içinde hazırlandı.

Sitokrom c, SOD, katalaz ve ksantin oksidaz pH=7,5 olan PBS tamponu içinde hazırlandı. Ksantin oksidaz enziminin ünitesini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$200 \mu\text{l} \cdot \frac{335\text{mU}}{1000\mu\text{l}} \cdot \frac{1 \text{ mg protein}}{1400 \text{ mU}} \cdot \frac{1\text{ml}}{12,8\text{mg}} = 3,74 \mu\text{l}$$

Son reaktifler:

Reaktif A	Reaktif B	Reaktif C
(son hacim 16 ml)	(son hacim 800 µl)	(son hacim 800 µl)
320 µl katalaz	57 µl ksantin oksidaz	57 µl ksantin oksidaz
320 µl ksantin	743 µl PBS	90 µl süperoksit dismutaz
755 µl Sitokrom c		653 µl PBS
14,6 ml PBS		

Mn-SOD aktivitesi için mitokondrial fraksiyonu belirlenen dilüsyon faktörü oranında dilüe edildikten sonra sonike edildi. Sonikasyondan sonra, 10000g'de 10 dk santrifüj edilerek çöken mitokondri atıkları atıldı. Süpernatanda Mn-SOD tayini yapıldı.

96'lık plate'de son hacim 250 µl olacak şekilde hazırlandı:

- A) Kör olarak distile su (250 µl)
- B) Kontrol 1: 125 µl Reaktif B
- C) Örnek: 5 µl örnek + 125 µl Reaktif B
- D) Kontrol 2: 125 µl Reaktif C

Tam ölçüm öncesinde kör hariç bütün küvetlere 125 µl Reaktif A eklendi, 50 sn süreyle plate çalkalayıcıda çalkalandı. Sitokrom c'nin indirgenmesi reaksiyonu 550 nm'de izlendi.

Hesaplamalar:

Üç farklı reaktif içinde sitokrom c'nin indirgenmesi reaksiyonlarından elde edilen eğrilerden ilkinde sitokrom c'nin XOD ile oluşan reaksiyonunda maksimum redüksiyonu bu kontrol ile gözlemlendi. Sitokrom c'nin XOD ile indirgenmesinin örnekteki SOD ile inhibisyonu ikinci eğri ile ifade edildi. SOD varlığında sitokrom c, XOD tarafından değil daha çok SOD tarafından yürütülen reaksiyon üzerinden yürütülür. Bu nedenle bu reaktifte sitokrom c redüksiyonu hemen hemen yok denecek kadar az olan üçüncü bir eğri ile ifade edildi. 1.ve 2.eğri kalan alan örnekteki SOD aktivitesini verirken, 2. ve 3. eğri arasında kalan alan XOD tarafından yürütülen reaksiyona aittir. 3. eğri ile "x" eksenini arasında kalan alan ise XOD aktivitesi olmayan reaksiyona aittir.

3.7. MİTOKONDRİLERDE PROTEİN TAYİNİ (BRADFORD YÖNTEMİ)

Standartların ve Küvetlerin Hazırlanması:

- 15 µg/ml dozunda hazırlanmış olan BSA sırasıyla 0, 3,6,9,12,15 µl 1ml'lik küvetlere kondu.
- Diğer taraftan 10 µl örnek alınarak üzerine 40 µl tampon eklenerek 1/5 dilüsyon elde edildi.
- Sonra bu dilüsyondan 5µl alınarak küvetlere kondu.
- Küvetlere 1,5 ml Bradford reaktifi eklendi ve çok amaçlı ELISA okuyucusunda (BioTek) 595 nm'de ölçüldü (75).

Bradford Reaktifinin Hazırlanışı:

- 100mg Commaşie Brilliant Blue G250 (C.I. 42655; Merck 1.15444.0025), %96'lık 50 ml etanol içinde çözüldü.
- Üzerine 100 ml %85'lik ortofosforik asit eklendi.
- 1000ml'ye bidistile suyla tamamlandı.

3.8. ERİTROSİTLERDE GSH-Px AKTİVİTESİ TAYİNİ

Eritrositlerde GSH-Px aktivitesi tayini mitokondriler için de kullanılan, yukarıda detaylı açıklaması bulunan yöntem ile gerçekleştirildi (73).

Aktivite= nmol NADPH okside / dk= 1mU GPx

NADPH ϵ = 6.22 cm² / μ mol

Aktivite (nmol/dk .ml) = mA/dk . 1000/6.22 formülleri ile hesaplandı.

3.9. ERİTROSİTLERDE KATALAZ (CAT) AKTİVİTESİ TAYİNİ**Kullanılan Çözeltiler:**

* 0,05 M fosfat tamponu, pH:7.0

0.05 M Na₂HPO₄.12H₂O, NaH₂PO₄ ile hazırlandı pH=7'ye ayarlandı.

* 37.5mM tamponlanmış H₂O₂ substratı

Eritrosit süspansiyonları önce 1/5 oranında distile su ile dilüe edildi. 3000 rpm'de 20dk santrifüj edildi. Elde edilen eritrosit lizatı 1/10 oranında dilüe edildikten sonra, 5dk içinde katalaz aktivitesi tayininde kullanıldı. 37.5mM H₂O₂ içeren tampondan 2990 μ l alındı üzerine 10 μ l dilüe örnek eklendi. Numune tüplerinin optik dansiteleri kendi fosfat tamponu körüne karşı UV spektroda 240nm'de 4 dk süreyle izlendi (76,77).

3.10. ERİTROSİTLERDE MALONDİALDEHİT (MDA) TAYİNİ

Eritrosit MDA tayininde, Stocks ve Dormandy tarafından geliştirilen (78) metod kullanıldı. Metoda göre, malondialdehit (MDA) oluşumu, lipid peroksidasyonunun bir indeksi olarak kabul edildi.

Metodun temel prensibi; lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek, 532 nm'de absorban veren bir kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır.

Çözeltiler

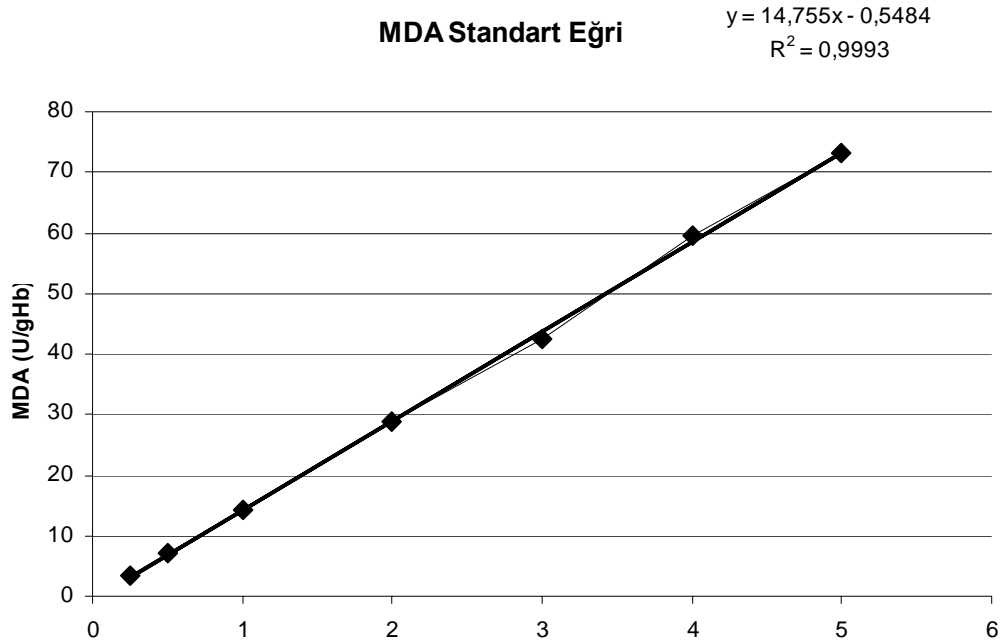
1. 0,015M PBS, pH: 7.4
2. %30 TCA (trikloro asetik asit)

3. %1 TBA (tiyobarbitürük asit,0.5 N NaOH içinde hazırlanır)
4. 0.1 M EDTA (etilen diamin tetra asetik asit)
5. 5.848 M MDA (malondialdehit bis (dimetil asetal), stok standart)

Çalışma günü 37°C su banyosunda bekletilmek suretiyle buzları çözdürülen eritrosit süspansiyonları, eşit hacimde PBS (pH:7.4) ile karıştırıldıktan sonra, MDA ölçümünde kullanıldı. Deney tüplerine sırasıyla; 0.4 ml eritrosit süspansiyonu, 1.6ml PBS ve 1ml %30'luk TCA pipetlenerek iyice karıştırıldı ve 200 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatantların 2ml'si ağzı kapaklı cam tüplere aktarıldı ve üzerlerine sırasıyla 0.15ml 0.1M EDTA ve 0.5ml %1'lik TBA pipetlenerek 15 dk su banyosunda kaynatıldı. Kendi halinde soğumaya bırakılan tüplerin optik dansitesi (OD), 0.4ml distile su ile aynı şekilde çalışılan kör tüpüne karşı, spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda okunarak MDA değerlendirilmesi standart eğri üzerinden yapıldı.

Standart Serinin Hazırlanması

Stok MDA (5.848 M) çözeltisinden, 100 nmol/ml konsantrasyonda hazırlanan ara stok standarttan 0.025: 0.05: 0.1: 0.2: 0.4: 0.5 nmol MDA/ml konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı ve numune gibi çalışıldı. MDA konsantrasyonlarına karşılık gelen OD değerleriyle standart eğri çizildi.



Şekil 3.7. Malondialdehit standart eğrisi

Standart eğriden bulunan eritrosit MDA seviyeleri (nmol/ml), aynı eritrosit süspansiyonlarında tayin edilen, Hb (g/ml) başına verildi (nmol MDA/g Hb).

3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

PZR datalarının analizi Relatif Ekspresyon Software’i aracılığı ile iki grup arası fixed reallokasyon randomizasyon testi aracılığı değerlendirildi. Reseptör ekspresyonundaki up-regülasyon ve down-regülasyon değerlendirmeleri program tarafından hesaplanan katsayı olarak artış yada azalma cinsinden ifade edildi.

Çalışma gruplarından elde edilen örneklerden ölçülen diğer parametreler ise, SPSS for Windows 13.0 paket bilgisayar programı kullanılarak, ortalamalar arası istatistiksel karşılaştırmalar One-way ANOVA, gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar ise Mann-Whitney-U testleri yardımıyla gerçekleştirildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

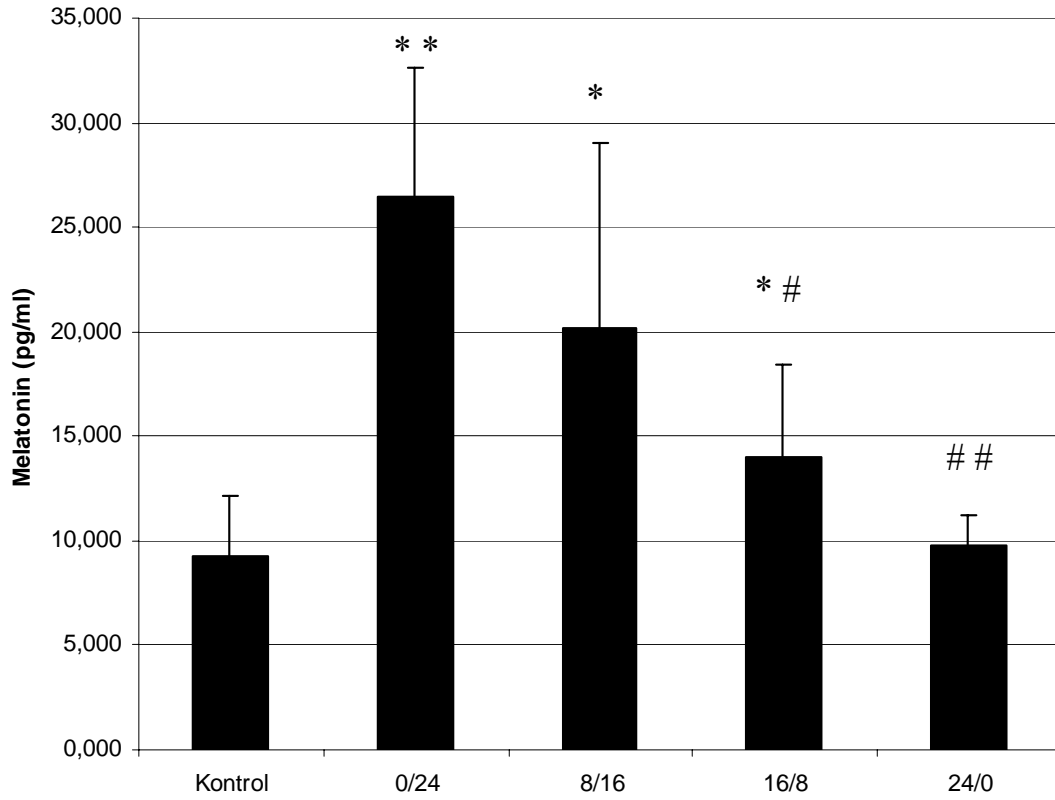
4. BULGULAR

Sirkadiyen ritim değişikliklerine bağlı olarak, plazma melatonin düzeyleri, pineal bezde MT1 ve MT2 reseptör ekspresyonu dağılımları, beyin dokusundan izole edilen mitokondrilerde GSH-Px ve MnSOD aktiviteleri, göz dokusundan izole edilen mitokondrilerde GSH-Px ve MnSOD aktiviteleri, eritrositlerdeki GSH-Px, CAT aktiviteleri ile MDA düzeyleri ve istatistiksel değerlendirmeleri aőaęıda verilmiştir:

4.1.PLAZMA MELATONİN DÜZEYLERİ

Plazma melatonin düzeyleri, 0/24 s A/K döngüsü uygulanan, diğer bir deyişle sırf karanlığa maruz bırakılan grupta anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Diğer gruplarda ise ışığa maruziyet arttıķça buna paralel olarak plazma melatonin düzeyleri de anlamlı olarak azalmış, ve sırf aydınlığa maruz kalan grupta plazma melatonin düzeyi kontrol grubuna yakın değerde bulunmuştur (şekil 4.1).

Plazma Melatonin Düzeyleri



Şekil 4.1. Plazma melatonin düzeyleri.

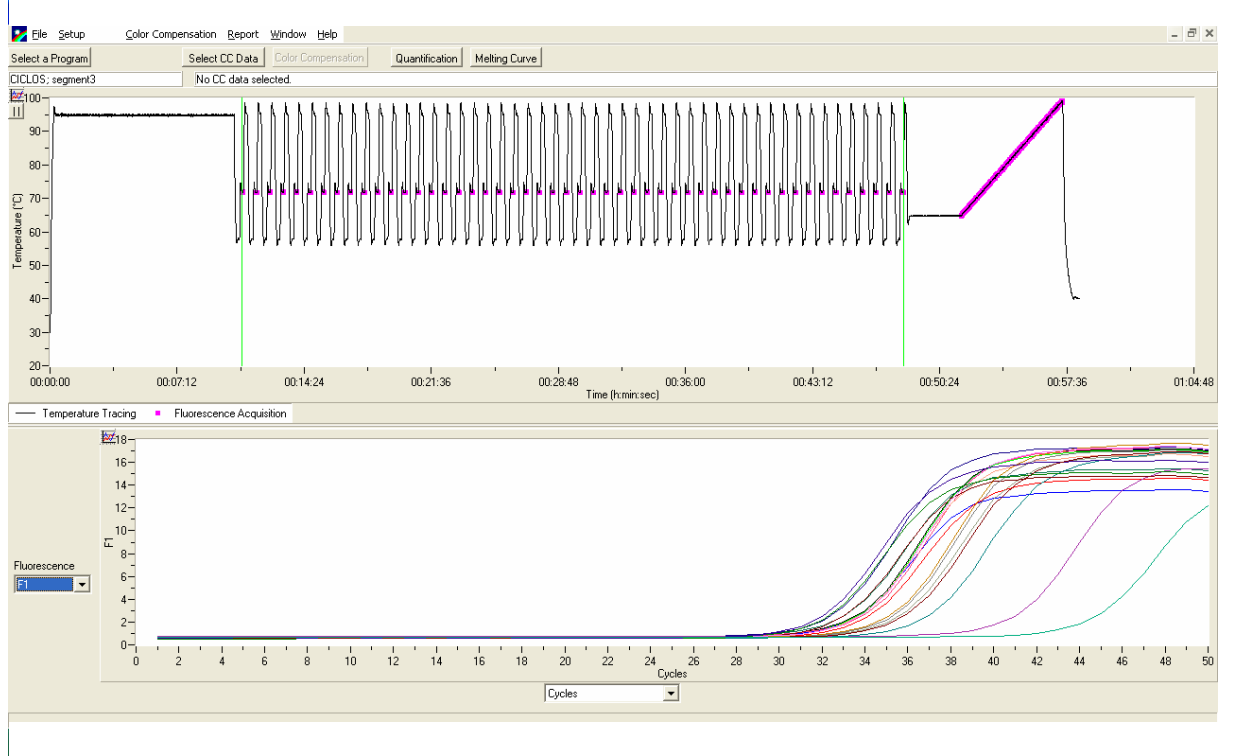
Kontrol: 12/12s A/K uygulanan grup. *: Kontrol grubuna göre $p < 0.001$, **: Kontrol grubuna göre $p < 0.05$. #: 0/24 s A/K grubuna göre $p < 0.05$, # #: 0/24 s A/K grubuna göre $p < 0.001$.

4.2. MELATONİN RESEPTÖR EKSPRESYONU

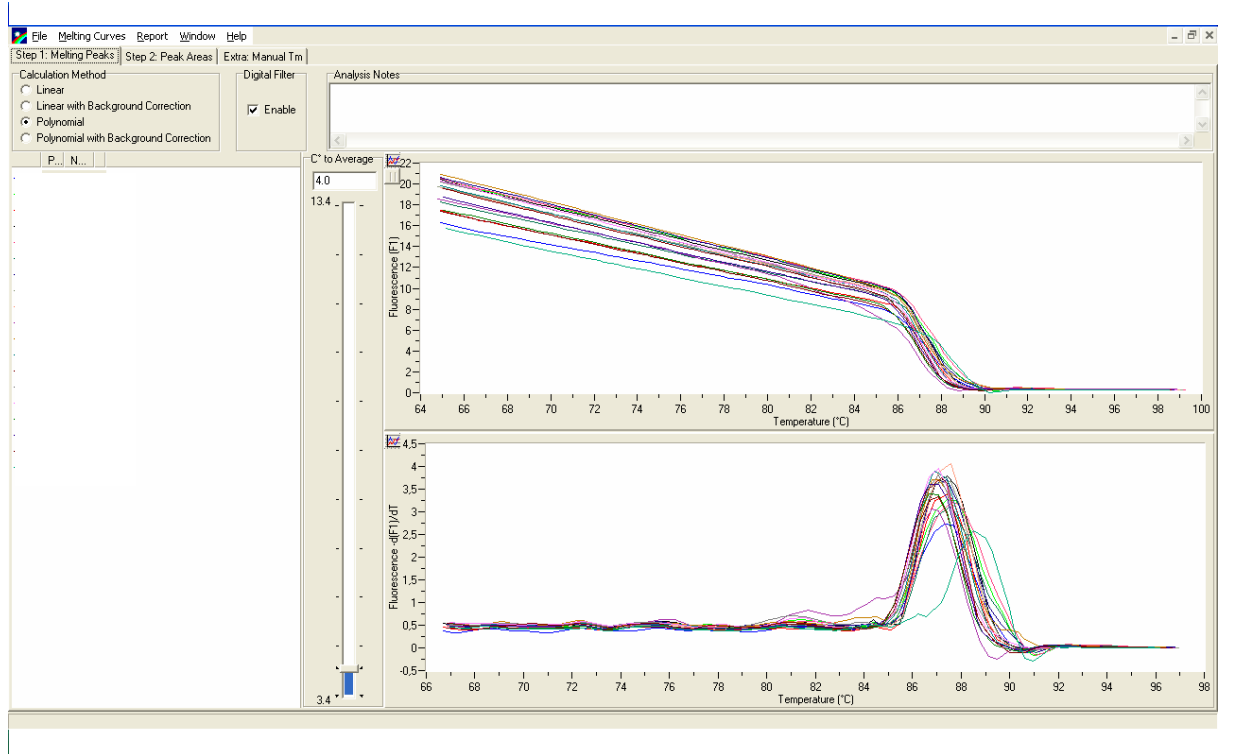
“Light Cycler” Sistemi software’i aracılığı ile gerçekleştirilen kantitatif analizde, analizin log-lineer fazı üzerinden hesaplamalar yapılmıştır. Farklı dilüsyonlarda hazırlanmış konsantrasyonu bilinen DNA ürünleri ile hazırlanan standart eğrilerin verdiği kuantifikasyon eğrileri üzerinden “İkinci Türevin Maksimumu” metodu ile miktar tayini yapılmıştır. Standart eğriden elde edilen “crossing point” değerleri üzerinden numunelere ait “crossing point” değerleri bulunmuş ve bu değerler üzerinde reseptörlerin up-regüle veya down-regüle olmaları bu sistem için geliştirilmiş özel “pair wise fixed reallocation randomisation test” ile hesaplanmıştır.

Bu verilerden elde edilen ve numunelere ait “Crossing Point” ve erime noktası eğrileri MT1 reseptörü için Şekli 4.2 ve 4.3’te, MT2 reseptörü için Şekil 4.4 ve 4.5’te verilmiştir.

4.2.1. MT1 Reseptörü Ekspresyonu



Şekil 4.2. MT1 reseptörü mRNA ekspresyonu kuantifikasyon eğrisi



Şekil 4.3. MT1 reseptörü mRNA ekspresyonu erime noktası tayini eğrisi

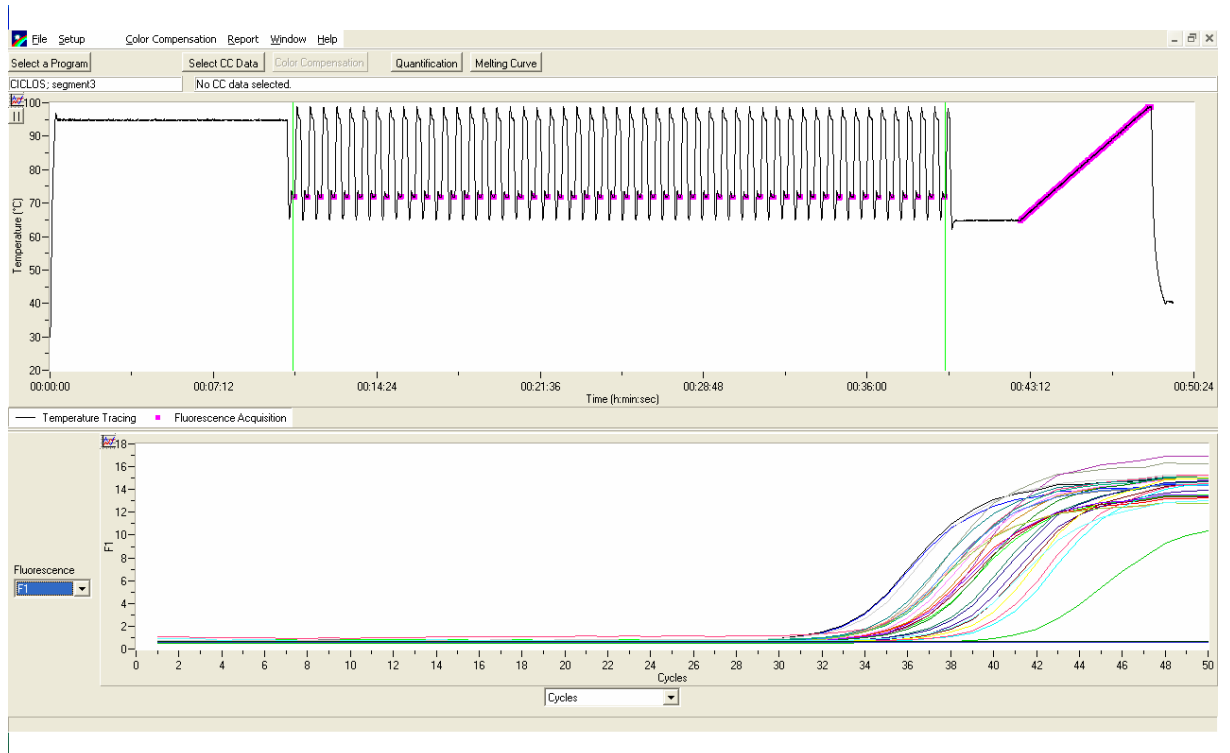
Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda; MT1 reseptörü 24/0s A/K grubunda kontrole göre down-regüle olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı

bulunmamıştır. 0/24s A/K grubunda ise MT1 reseptörlerinde kontrol grubuna göre anlamlı derece up-regülasyon olduğu görülmüştür ($p<0.001$). 16/8s A/K grubunda da kontrole göre anlamlı derecede down-regülasyon olurken ($p<0.05$), 8/16 s A/K döngüsü uygulanan grupta MT1 reseptörleri up- regüle olmuştur ve bu artış istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p<0.001$). Sırf karanlık uygulanan grup olan 0/24s A/K grubundaki MT1 reseptörlerinin ise sırf aydınlık uygulanan grup olan 24/0s A/K uygulanan gruba göre istatistiksel olarak önemli derecede up-regüle olduğu bulunmuştur($p<0.001$)(Tablo 4.1).

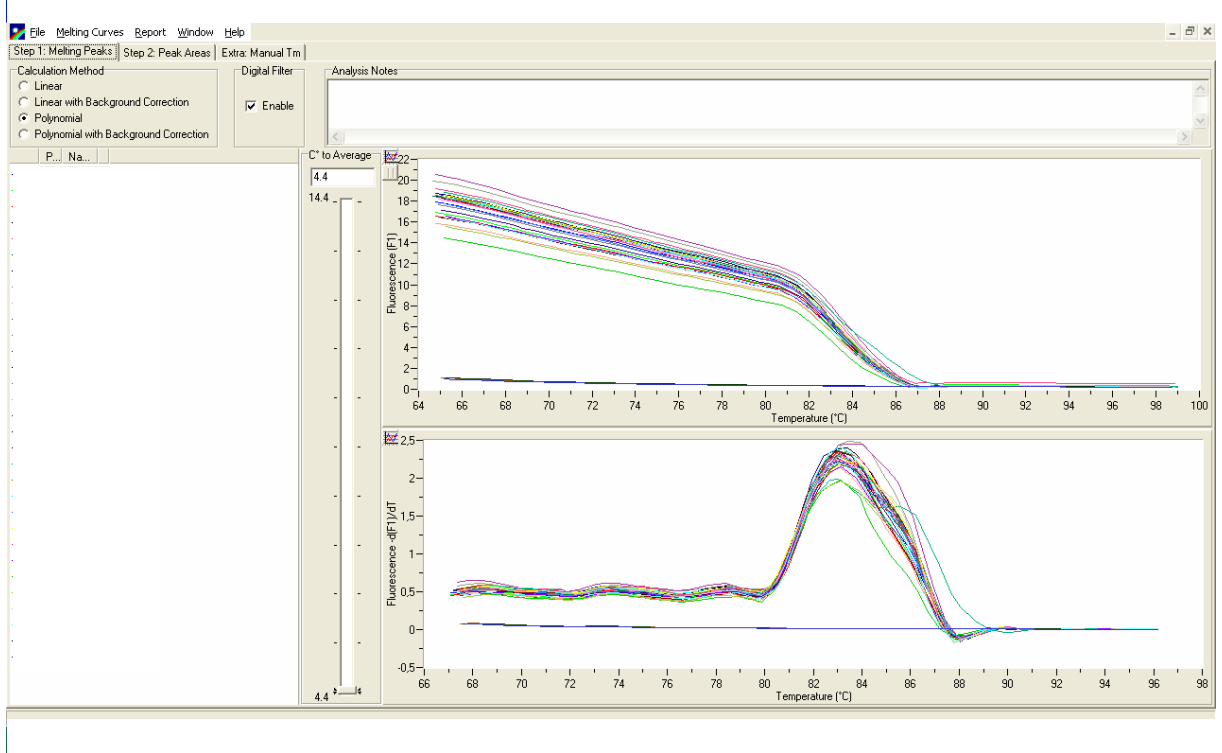
Tablo 4.1. MT1 reseptörüne ait mRNA ekspresyonu değerlendirme tablosu

Gruplar	Up-regülasyon	Down-regülasyon	Faktör	p değerleri
Kontrol ve 24/0s A/K g.		X	1.33	$p>0.05$
Kontrol ve 0/24s A/K g.	X		27.509	$p<0.001$
Kontrol ve 16/8s A/K g.		X	4.108	$p<0.05$
Kontrol ve 8/16s A/K g.	X		18.454	$p<0.001$
24/0s A/K ve 0/24s A/K	X		30.141	$p<0.001$

4.2.2. MT2 Reseptörü Ekspresyonu



Şekil 4.4. MT2 reseptörü mRNA ekspresyonu kuantifikasyon eğrisi



Şekil 4.5. MT1 reseptörü mRNA ekspresyonu erime noktası tayini eğrisi

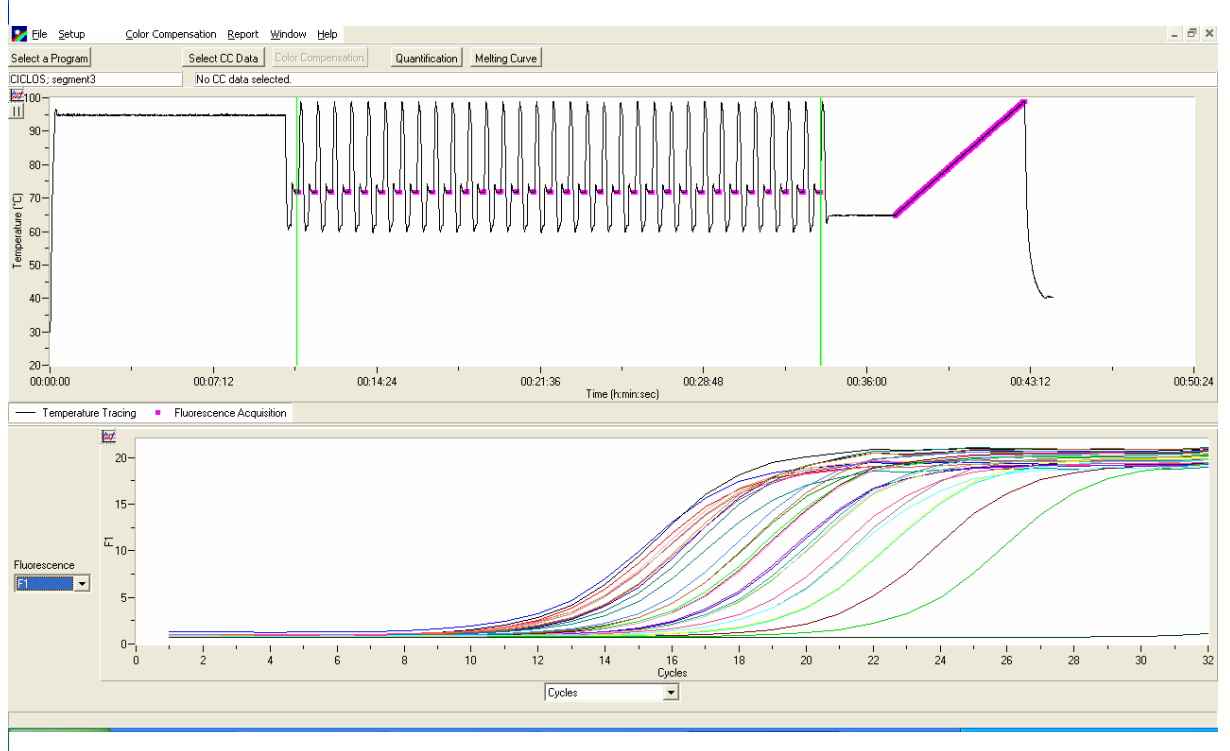
Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda; MT2 reseptörü 24/0s A/K grubunda kontrole göre down-regüle olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 0/24s A/K grubunda ise MT2 reseptörlerinde kontrol grubuna göre anlamlı derece up-regülasyon olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). 16/8s A/K grubunda da kontrole göre anlamlı derecede down-regülasyon olurken ($p < 0.05$), 8/16 s A/K döngüsü uygulanan grupta MT2 reseptörleri up-regüle olmuştur ve bu artış istatistiksel olarak da önemlidir ($p < 0.05$). Sırf karanlık uygulanan grup olan 0/24s A/K grubundaki MT2 reseptörlerinin ise sırf aydınlık uygulanan grup olan 24/0s A/K uygulanan gruba göre istatistiksel olarak önemli derecede up-regüle olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. MT2 reseptörüne ait mRNA ekspresyonu değerlendirme tablosu

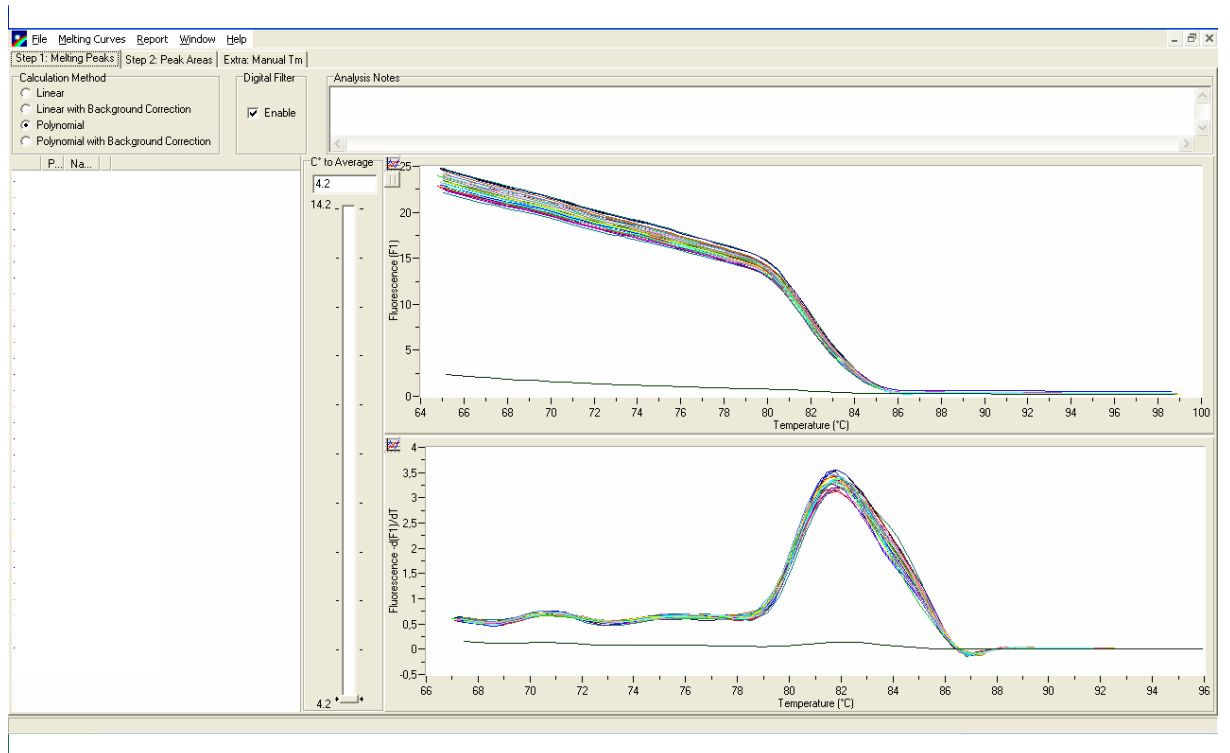
Gruplar	Up-regülasyon	Down-regülasyon	Faktör	p değerleri
Kontrol ve 24/0s A/K g.		X	1.17	$p > 0.05$
Kontrol ve 0/24s A/K g.	X		2.88	$p < 0.05$
Kontrol ve 16/8s A/K g.		X	3.87	$p < 0.05$
Kontrol ve 8/16s A/K g.	X		5.41	$p < 0.05$
24/0s A/K ve 0/24s A/K	X		3.66	$p < 0.05$

Housekeeping genlerine ait gerçek zamanlı PZR sonuçları ise Şekil 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9'da verilmiştir.

4.2.3. 18S Housekeeping geni

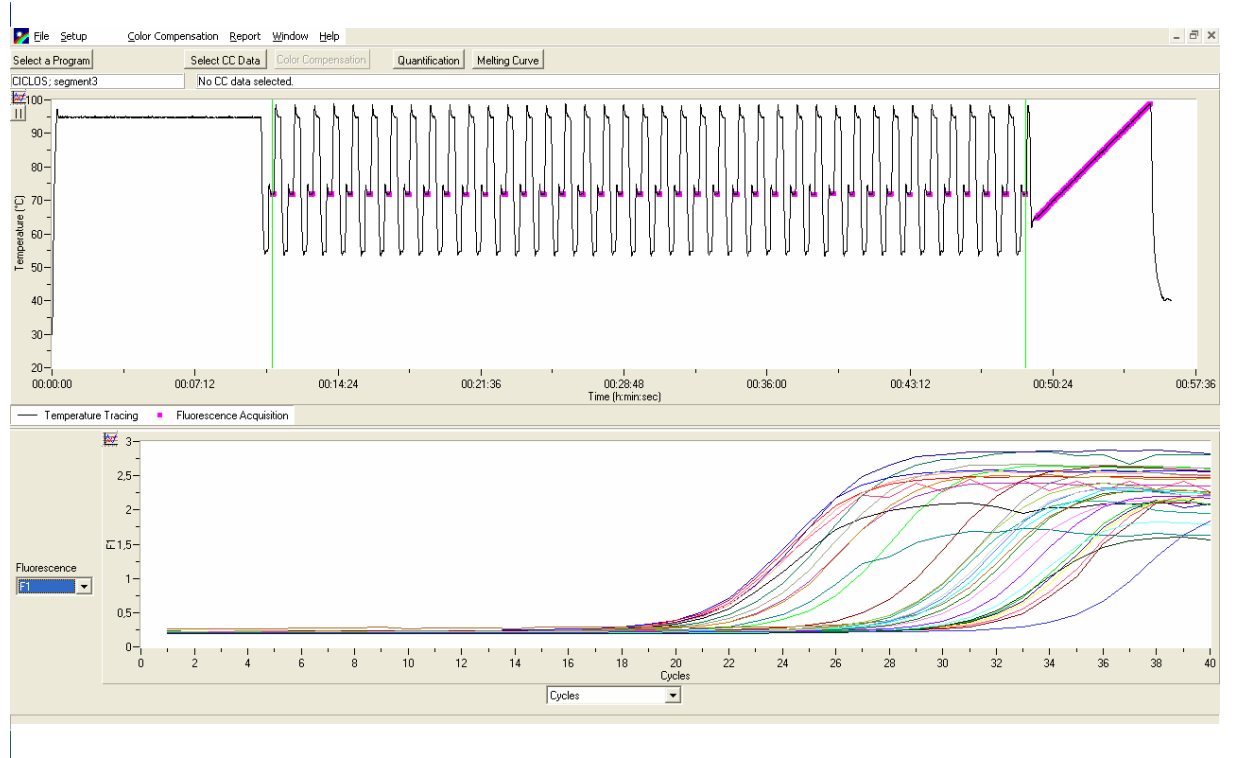


Şekil 4.6. 18S geni mRNA ekspresyonu kuantifikasyon eğrisi

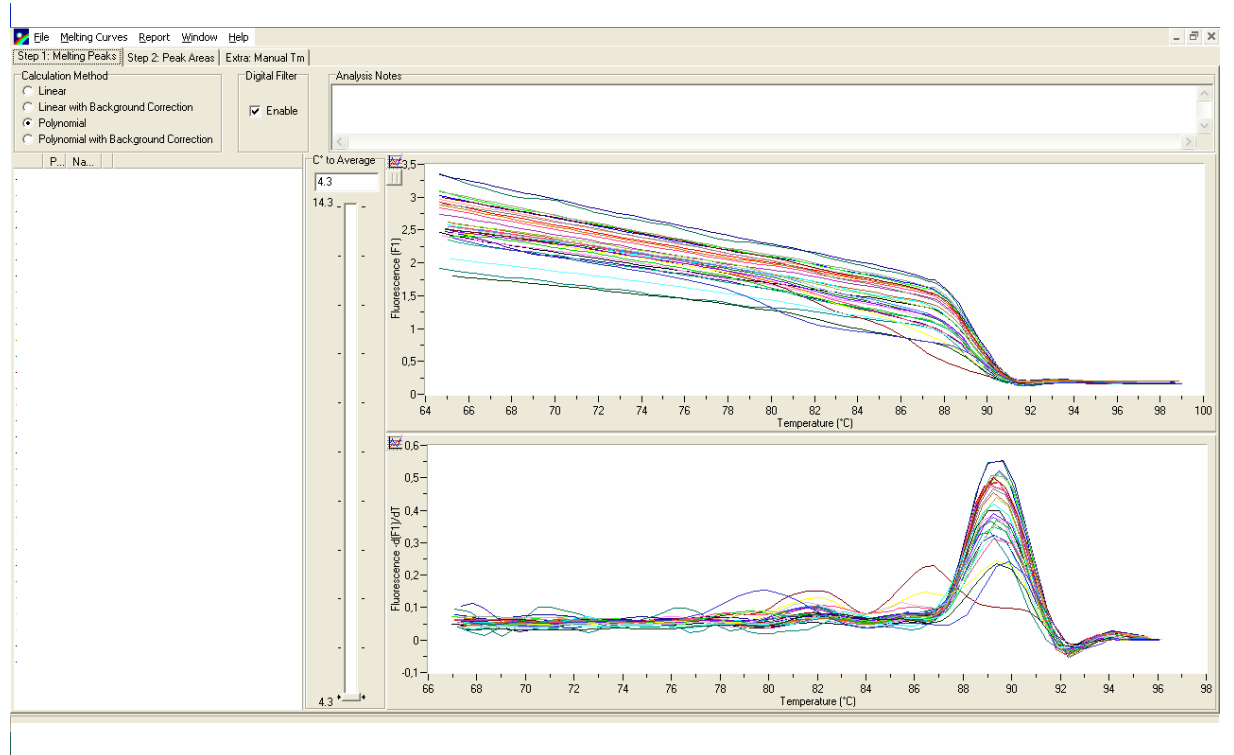


Şekil 4.7. 18S geni mRNA ekspresyonu erime noktası tayini eğrisi

4.2.4. β -Actin Housekeeping geni



Şekil 4.8. β -Actin mRNA ekspresyonu kuantifikasyon eğrisi

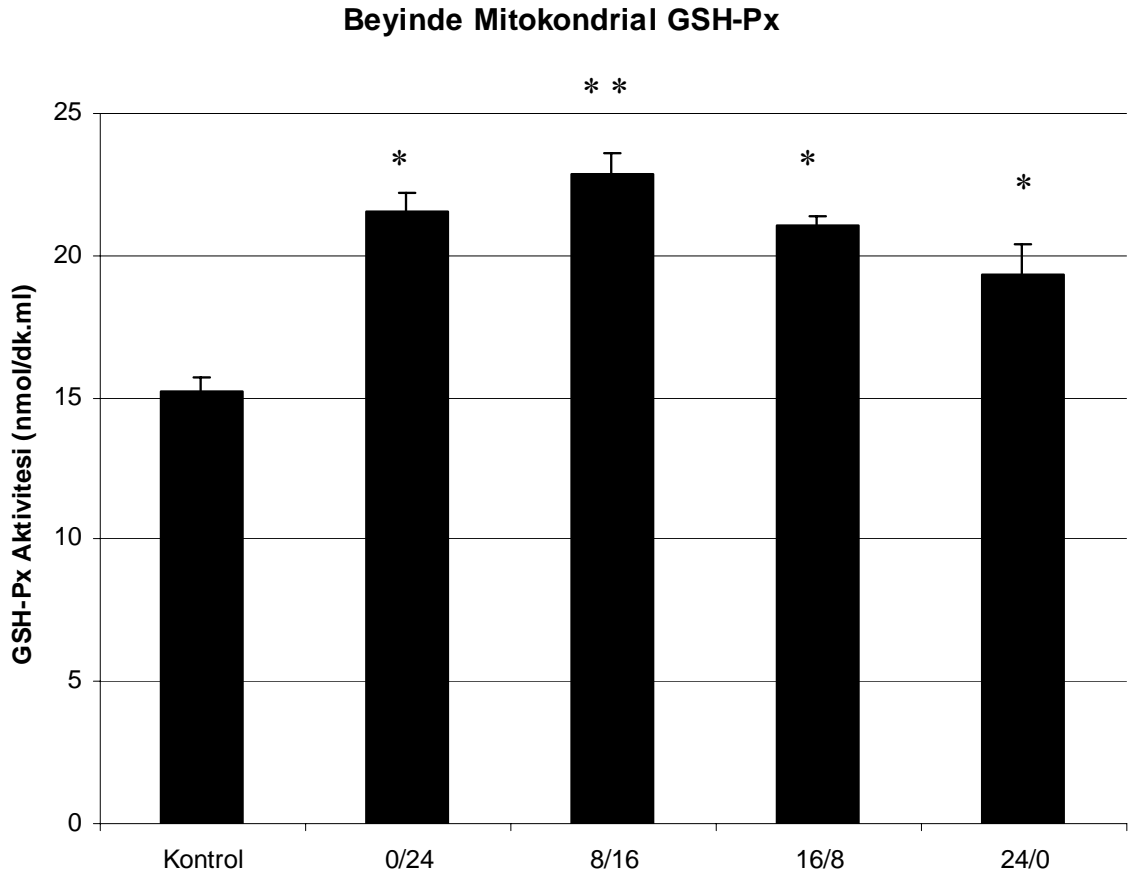


Şekil 4.9. β -Actin mRNA ekspresyonu erime noktası tayini eğrisi

4.3. BEYİN DOKUSU MİTOKONDRİLERİNDEKİ BULGULAR

4.3.1. Beyin Mitokondrilerinde Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi

Beyin dokusu homojenatından izole edilen mitokondrilerde GSH-Px aktivitesi, A/K döngüsü değiştirilen bütün gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Bu gruplardan özellikle de 8/16 s A/K döngüsü uygulanan grupta bu artış çok daha önemlidir ($p<0.001$). Bu sonuçlar da farklı aydınlık / karanlık döngüsüne maruz kalındığında beyin hücreleri mitokondrilerindeki H_2O_2 moleküllerinden kaynaklanan hasarın önlenmesinde antioksidan savunma sistemini oluşturan GSH-Px önemli bir rol oynadığını göstermektedir. 0/24s, 8/16 s, 16/8 s ve 24/0s A/K uygulanan gruplar arasında ise istatistiksel bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Beyinde mitokondrial GSH-Px aktivitesi

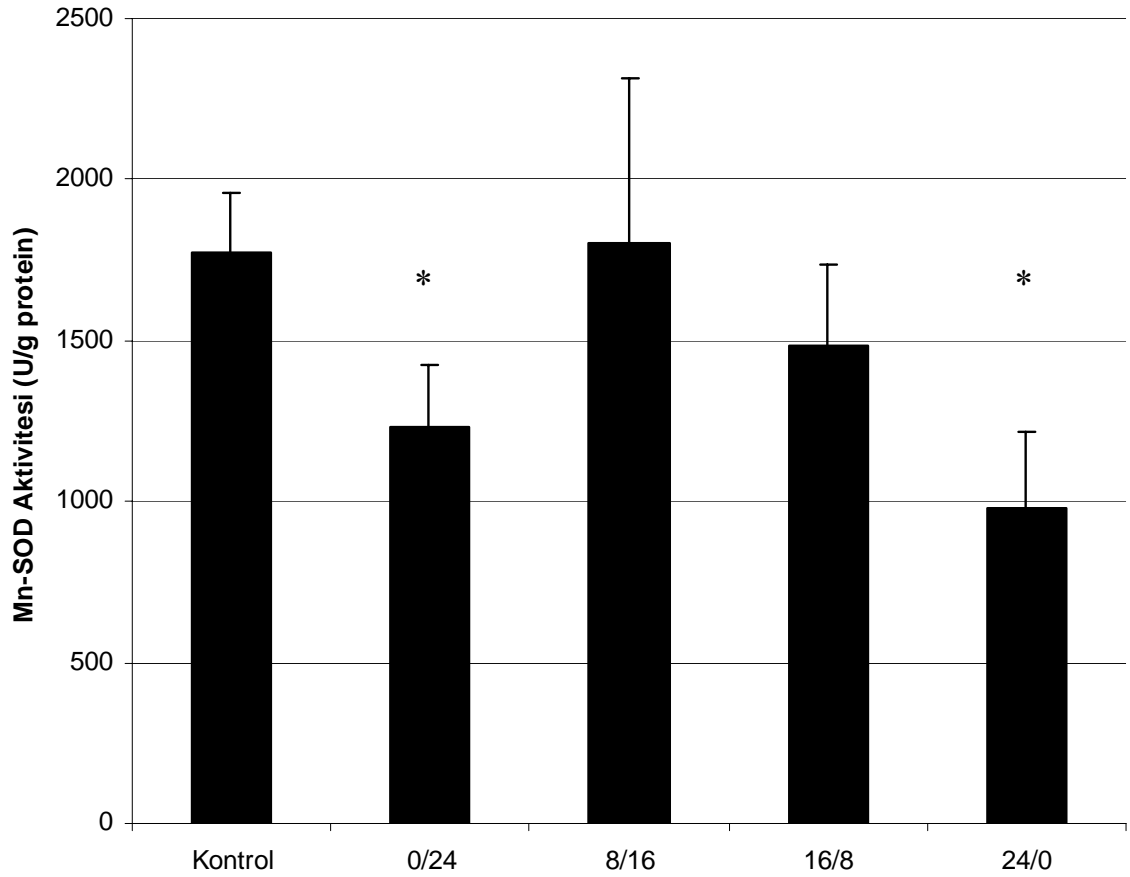
Kontrol: 12/12s A/K uygulanan grup. *: Kontrol grubuna göre $p<0.05$.

** Kontrol grubuna göre $p<0.001$.

4.3.2. Beyin Mitokondrilerinde Mn-SOD Aktivitesi

Beyin dokusu homojenatından izole edilen mitokondrilerde Mn-SOD aktivitesi değerlendirildiğinde, 0/24 ve 24/0 s A/K siklusu uygulanan gruplarda anlamlı derecede azalma olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). 8/16 ve 16/8 s A/K siklusu uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik bulunmamıştır. Bu sonuçlar da Mn-SOD enziminin GSH-Px enzimi ile antioksidan savunma sisteminde öncelikleri farklı olan ve dengeleyici bir rol oynayabileceğinin göstergesidir. Kontrol grubu, 8/16 s ve 16/8 s A/K uygulanan gruplarda ise istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.11).

Beyinde Mitokondrial Mn-SOD AKTİVİTESİ



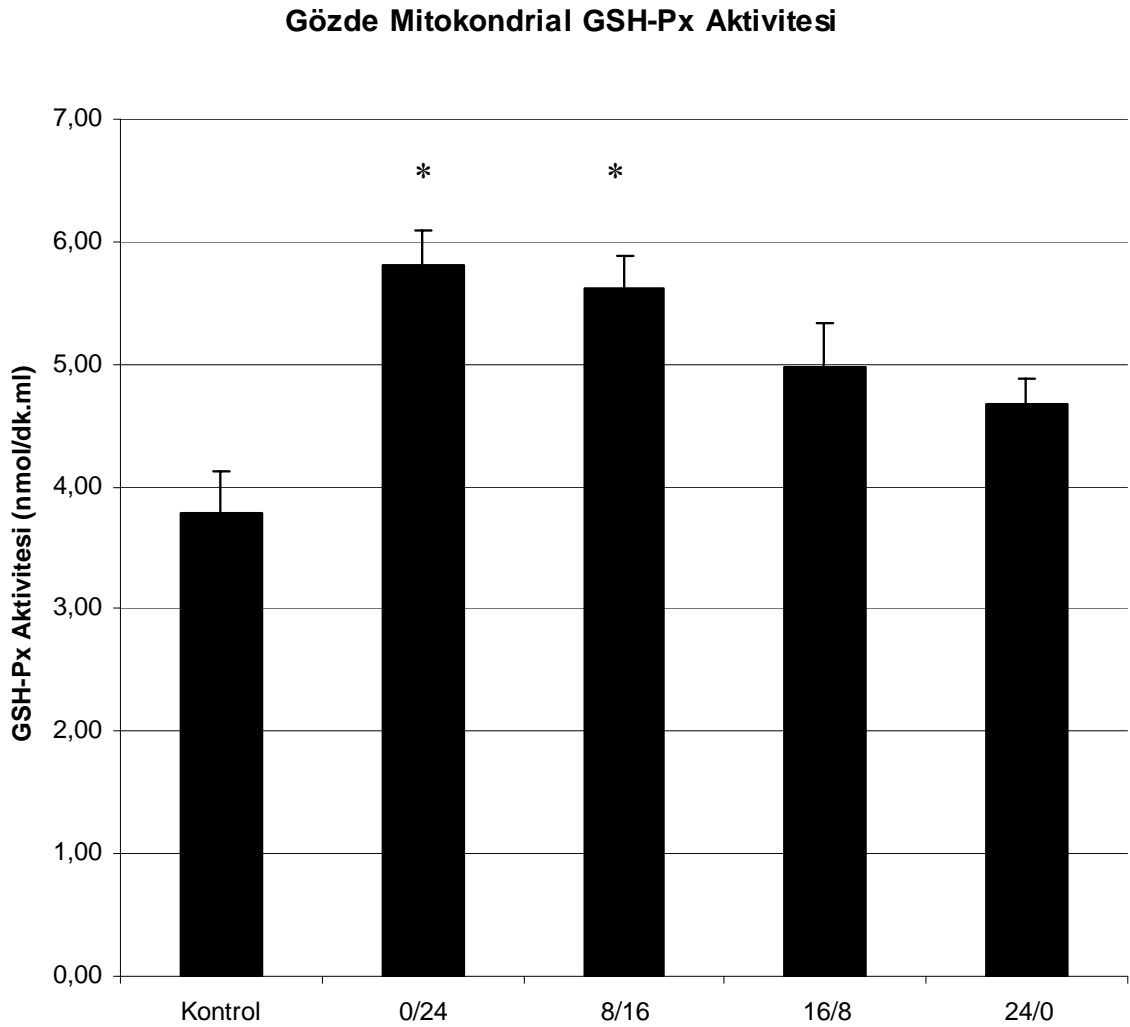
Şekil 4.11. Beyinde mitokondrial Mn-SOD aktivitesi

Kontrol: 12/12s A/K uygulanan grup. *: Kontrol grubuna göre $p<0.05$.

4.4. GÖZ DOKUSU MİTOKONDRİLERİNDEKİ BULGULAR

4.4.1. Göz Mitokondrilerinde Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi

Göz dokusu homojenatından izole edilen mitokondrilerde GSH-Px aktivitesi, 0/24 s ve 8/16 s A/K döngüsü uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir artış göstermiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.12).

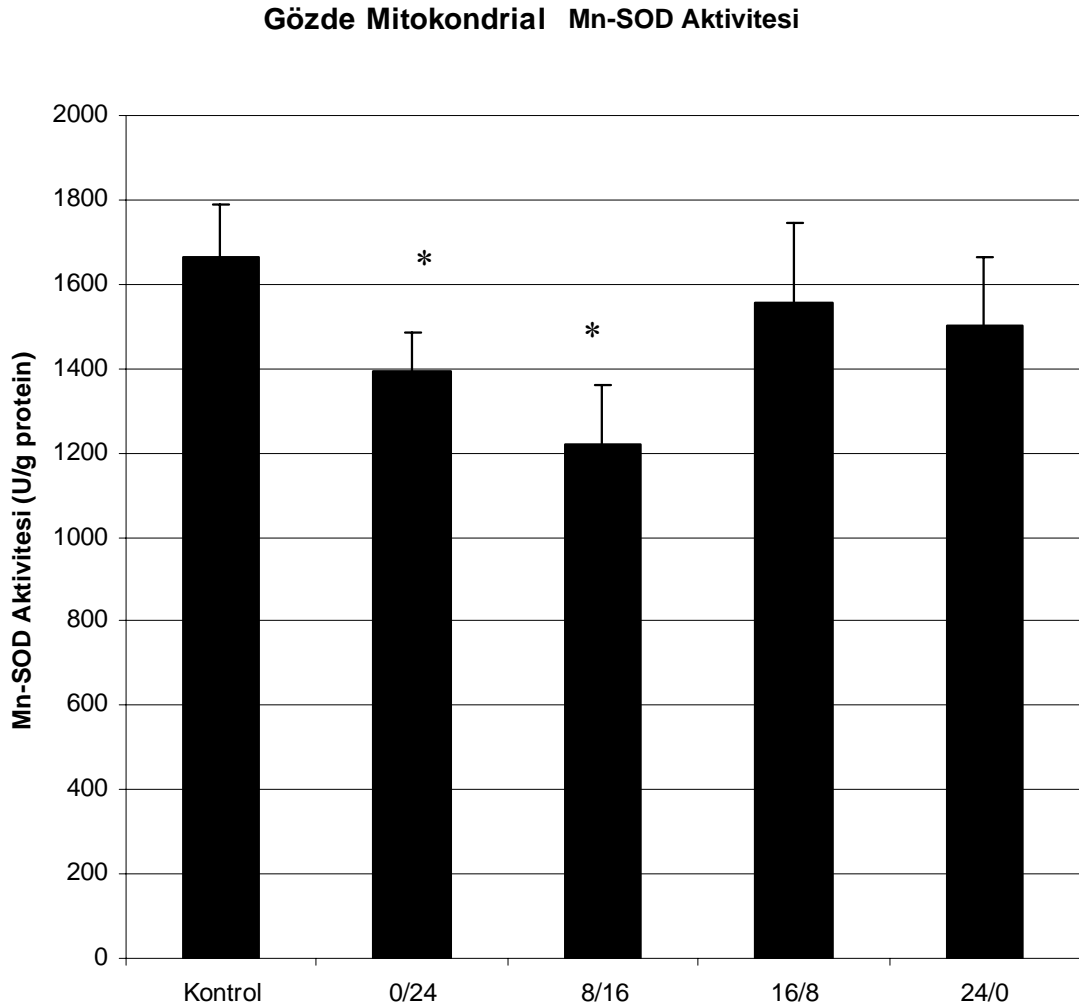


Şekil 4.12. Gözde mitokondrial GSH-Px aktivitesi

Kontrol: 12/12s A/K uygulanan grup. *: Kontrol grubuna göre $p<0.05$.

4.4.2. Göz Mitokondrilerinde Mn-SOD Aktivitesi

Göz dokusu homojenatından izole edilen mitokondrilerde Mn-SOD aktivitesi 0/24s ve 8/16 s A/K döngüsü uygulanan, gruplarda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). Gözde mitokondrial antioksidan enzimlerinden elde edilen sonuçlar, beyindeki mitokondrial antioksidan enzimlerle benzer özellikler göstermiştir (Şekil 4.13).



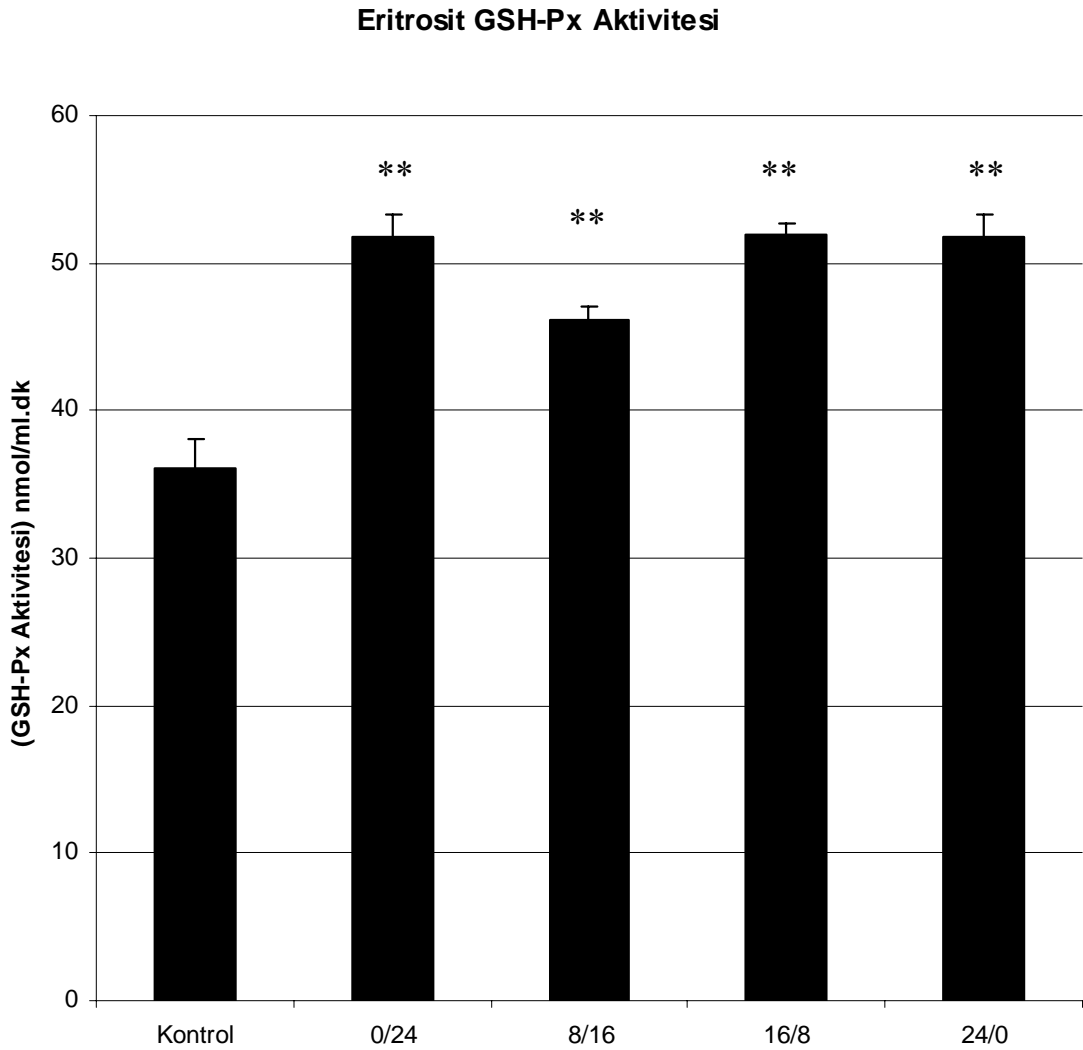
Şekil 4.13. Gözde mitokondrial Mn-SOD aktivitesi

Kontrol: 12/12s A/K uygulanan grup. *: Kontrol grubuna göre $p<0.05$.

4.5. ERİTROSİTLERDEKİ BULGULAR

4.5.1. Eritrositlerde GSH-Px Aktivitesi

Eritrositlerde GSH-Px aktivitesi, oksidatif hasarın bir göstergesi olarak bütün gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$) (Şekil 4.14).

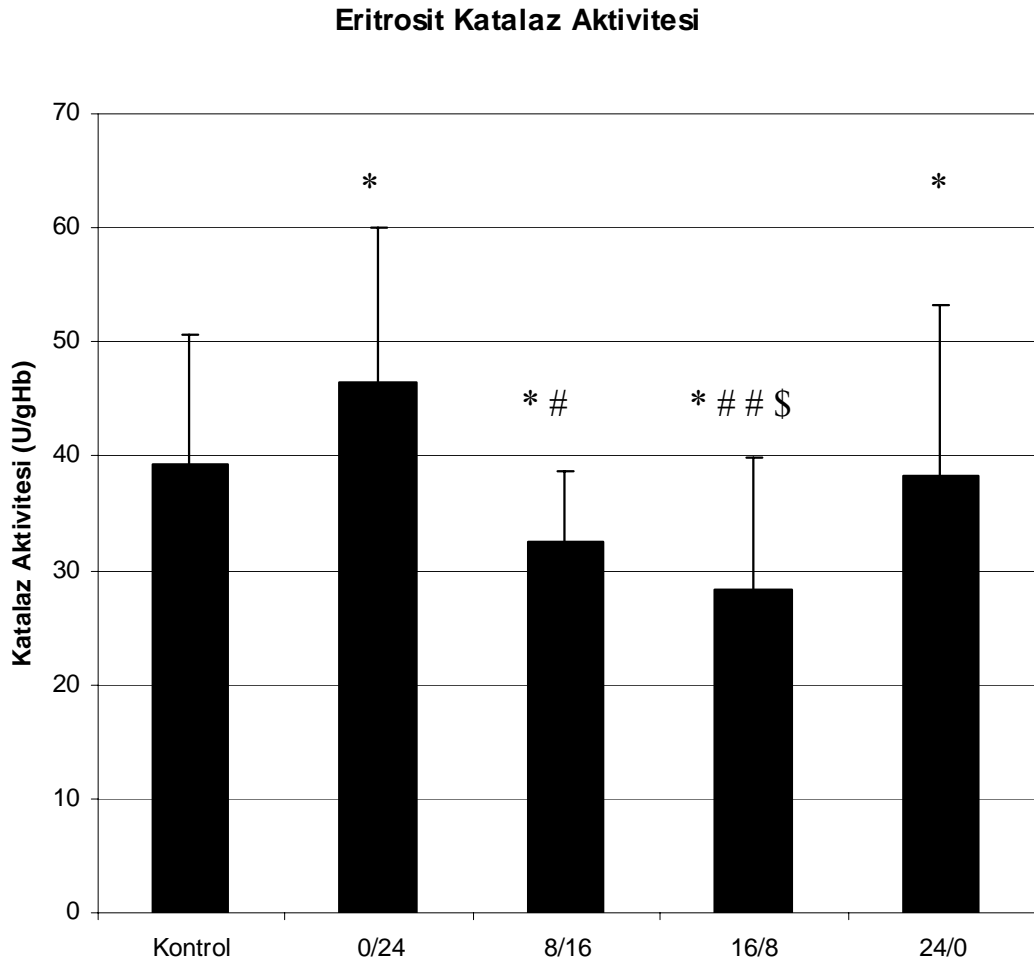


Şekil 4.14. Eritrositlerde GSH-Px aktivitesi

Kontrol: 12/12s A/K uygulanan grup. **: Kontrol grubuna göre $p<0.001$.

4.5.2. Eritrositlerde Katalaz Aktivitesi

Eritrositlerde katalaz (CAT) aktivitesi, 0/24 s A/K döngüsü uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken ($p<0.05$), 24/0 s A/K uygulanan grupta herhangi önemli bir değişiklik görülmemiştir. 8/16 s ve 16/8 s A/K döngüsü uygulanan gruplarda ise katalaz aktivitesinde kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir azalma olmuştur ($p<0.05$). Ayrıca bu gruplarda katalaz aktivitesindeki azalma 0/24 s A/K grubuna göre azalma da istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.05$ ve $p<0.001$). Son olarak, 16/8 s A/K döngüsüne tabi tutulan gruptaki azalma 24/0 s A/K uygulanan gruba göre de önemlidir ($p<0.05$) (Şekil 4.15).

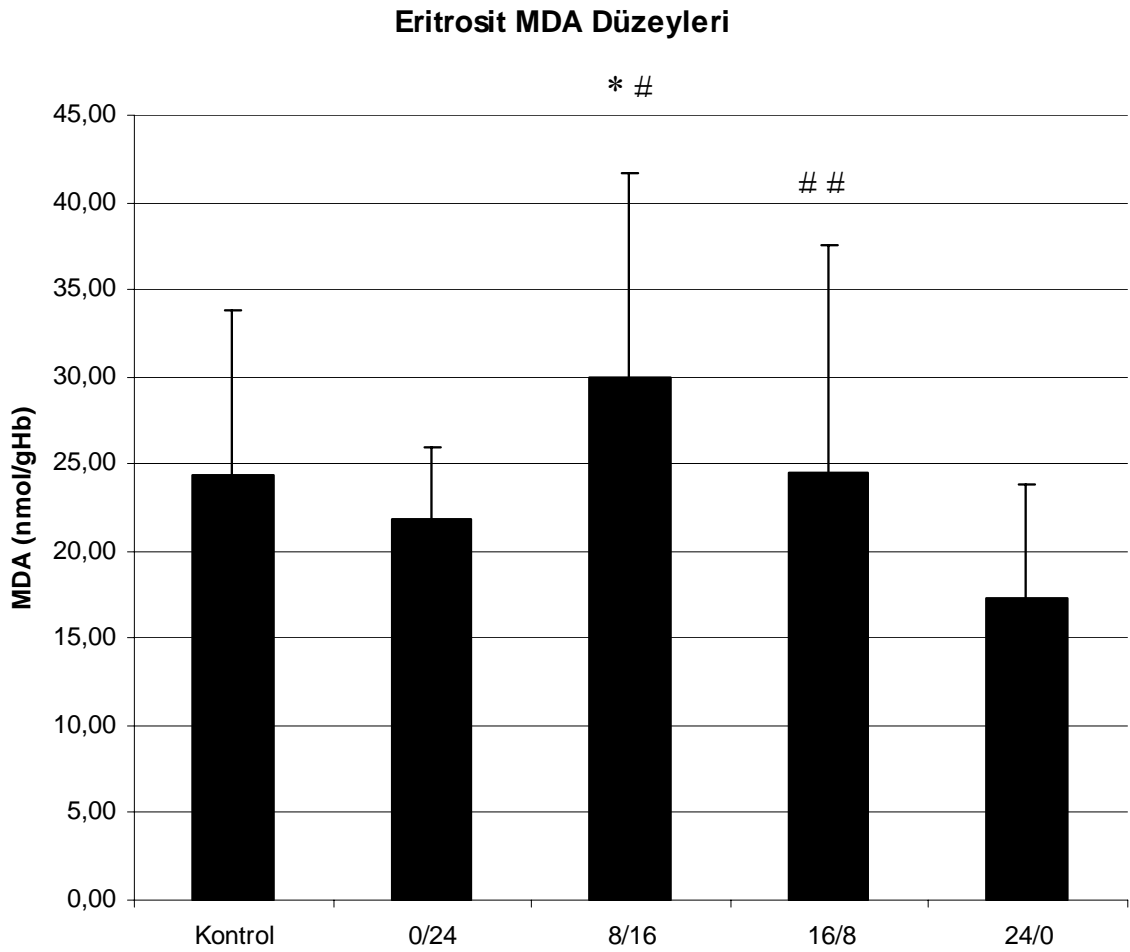


Şekil 4.15. Eritrositlerde CAT aktivitesi

Kontrol: 12/12s A/K uygulanan grup. *: Kontrol grubuna göre $p<0.05$. # 0/24 s A/K grubuna göre $p<0.05$, ## : 0/24 s A/K grubuna göre $p<0.001$, \$: 24/0 grubuna göre $p<0.05$.

4.5.3. Eritrositlerde MDA Düzeyleri

Eritrositlerde zardaki lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeyleri değerlendirildiğinde, en fazla MDA düzeyinin 8/16 s A/K döngüsü uygulanan grupta olduğu görülmüştür. Bu gruptaki MDA düzeyindeki değişiklikler kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış ancak 0/24 ($p<0.05$) ve 24/0 ($p<0.01$) gruplarına göre önemli derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Eritrositlerde MDA düzeyleri

Kontrol: 12/12s A/K uygulanan grup. *: 0/24 grubuna göre $p<0.05$,

#: 24/0 grubuna göre $p<0.001$. # #: 24/0 grubuna göre $p<0.05$.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Canlılarda biyolojik saatler, hücresel ve sistemsel fonksiyonların yürütülmesinde oldukça önemli roller üstlenmişlerdir. Bu biyolojik saatlerin en önemlilerinden biri de dünyanın güneş etrafındaki dönüşü ile ilgili olan ritimlerdir. Sirkadiyen ritim olarak adlandırılan bu gece-gündüz ritimleri birçok hormonal iletinin temelini oluşturur ve bu hormonlardan en önemlisi geceleri sentezi artan ve gündüzleri inhibe olan, diğer bir deyişle sentezi nokturnal salım gösteren melatonin hormonudur. Melatoninin biyolojik sistemler üzerindeki etkileri gece-gündüz döngüsünün düzenlenmesinin ötesinde, kan basıncı ve vücut ısısının düzenlenmesindeki, mevsimsel üreme fonksiyonlarının düzenlenmesindeki, kanser, Alzheimer gibi hastalıklardaki rolü ve antioksidan etkileridir (3,6).

Bu nedenle plazma melatonin düzeyleri ve bu düzeylerin melatonin reseptörleri olan MT1 ve MT2 reseptörleri aracılı etkilerinin aydınlatılması birçok fizyolojik özelliğinin aydınlatılması açısından önem taşımaktadır. Daha önce melatonin reseptörleri üzerinde yapılan çalışmalar, daha çok biyolojik saatin düzenlenmesinde başlıca rolü üstlendiği düşünülen SCN ve hipofizin pars tuberalis bölgesinde gerçekleştirilmiştir (79). Çalışmamız, sirkadiyen ritimleri değiştirilen sıçanlarda plazma melatonin düzeyleri ve bu düzeyleri etkileyen pineal bezdeki melatonin reseptör ekspresyonu arasındaki ilişkinin Real-Time PCR teknolojisi ile ilk kez gösterildiği ve plazma melatonin

düzeyleri ile pineal bez melatonin reseptörü ilişkisinin olası mekanizmaları ile aydınlatılmaya çalışıldığı ilk çalışma olma özelliğindedir.

Melatoninin biyolojik saatler üzerine etkilerinin yanı sıra antioksidan etkilerinin de olduğu ilk kez 1990'lı yıllarda bulunmuş olmasına rağmen (80) bu konu üzerindeki çalışmalar oldukça hızlı gelişim göstermiş ve fizyolojik birçok olayda ve birçok hastalığın patojenezinde melatoninin antioksidan etkileri ile önemli görevler üstlendiği gösterilmiştir (5). Melatoninin lipofilik özellikte olması nedeniyle sadece hücresel değil, hücre içi birçok organelde de antioksidan etkilerini gösterdiği bilinmektedir (81). Mitokondriler de hücresel fonksiyonlardan oldukça önemlilerinden biri olan enerji üretimini üstlenmiş organeldir. Hücrelerin hayati fonksiyonlarının idame ettirilmesinde mitokondrilerde üretilen ATP'nin defosforilasyonu esnasında yüksek enerjili fosfat bağlarından açığa çıkan enerji kullanılmaktadır (44). O nedenle mitokondrilerin ATP üretiminde meydana gelen herhangi bir aksaklık diğer birçok hücresel mekanizmanın bozulması sonucunda hücreyi apoptozise götürecektir (46). Hücrelerin apoptozisinde mitokondrilerde birçok zincirleme olay gerçekleşir. Son yıllarda gösterilen en önemli mekanizmalardan biri de; hücre içi Ca^{+2} akışının artmasına bağlı olarak mitokondrial membran permeabilitesinin (MMP) değişmesi ve buna bağlı olarak açılan mitokondrial geçiş porlarından (MTP) <1500kDa olan moleküllerin bile geçişine izin verilmesidir. Bu Ca^{+2} akışı aynı zamanda apoptotik proteinlerden olan Caspase 3 ve Caspase 9'un sentezlerinin tetiklenmesi sonucunda da mitokondrial DNA hasarına yol açmakta ve ardından da apoptozis gerçekleşmektedir (47,48). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, melatoninin antioksidan etkileri ile mitokondrilerdeki bu mekanizmaların önlenmesinde oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (58-61). Ancak bu çalışmalar genellikle melatoninin farmakolojik dozlarında gösterilmiş, fizyolojik dozlardaki değişikliklerin mitokondriler üzerindeki antioksidan etkileri aydınlatılmamıştır. Bu nedenle çalışmamız, sirkadiyen ritimleri değiştirilmek suretiyle fizyolojik melatonin düzeyleri değiştirilen sıçanların beyin ve göz dokularından elde edilen mitokondrilerde antioksidan enzimlerin aktivitelerinin nasıl etkilendiğini de gösteren ilk çalışma olma özelliğindedir.

Çalışmada sıçanlar bir hafta süreyle 12/12, 0/24, 8/16, 16/8 ve 24/0 s A/K döngülerine tabi tutulmuş ve farklı sirkadiyen ritimlere bağlı olarak plazma melatonin düzeylerindeki değişiklikler değerlendirilmiştir. Plazma melatonin düzeyleri, 0/24 s A/K döngüsü uygulanan, diğer bir deyişle sürekli karanlığa maruz bırakılan grupta anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Plazma melatonin düzeyleri

insanlarda gün boyunca 4pg/ml ile 75pg/ml arasında değişim gösterebilmekte ve insanlarda gece maksimum ortalama 60pg/ml’lik bir değere ulaşmaktadır (9). Bu çalışmada sıçanların bir hafta süre ile karanlığa maruz bırakılmaları durumunda plazma melatonin düzeyleri kontrol grubuna ve sürekli aydınlık uygulanan gruba göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Diğer gruplarda ise ışığa maruziyet arttıkça buna paralel olarak plazma melatonin düzeyleri de anlamlı olarak azalmış, ve sürekli aydınlığa maruz kalan grupta plazma melatonin düzeyi kontrol grubuna yakın değerde bulunmuştur.

Pineal bezde Syber Green 1 floresans boyama esasına dayalı gerçek zamanlı PZR (Real-Time PCR) yöntemi ile reseptör ekspresyonunun değerlendirildiği ilk çalışma olan çalışmamızda, uzun süreli olarak sıçanların alıştıkları A/K döngüsünden farklı A/K döngüsü uygulaması, pineal bezde melatonin reseptör düzeylerinin de up-regüle veya down regüle olması ile sonuçlanmıştır. Oldukça yeni bir teknik olması nedeniyle, bu yöntemde kullanılan melatonin reseptörlerinin ekspresyonu ile ilgili deney prosedürü ilk kez bu çalışma ile geliştirilmiştir. Çalışma esnasında TaqMan floresan boyası kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PZR ile melatonin reseptörlerinin farklı dokulardaki ekspresyonlarının değerlendirildiği çalışmalar (82) baz alınmıştır.

Melatonin reseptörleri üzerine yapılan çalışmalar genellikle farmakolojik ve fizyolojik düzeylerin gece ve gündüz reseptör afinitesi, reseptör dansitesi ve spesifik reseptör sensitizasyonu üzerine gerçekleştirilmiştir. MT1 ve MT2 reseptörlerinin varlığı ilk kez 1988 yılında Reppert ve ark. tarafından gösterilmiştir (83). Bu reseptörler ilk tanımlandıklarında Mel1a ve Mel1b olarak adlandırılmış, daha sonra nomenklatüre uygun olarak isimleri Dubochovic ve ark. tarafından MT1 ve MT2 olarak değiştirilmiştir (84). Melatonin reseptörlerinin insan pineal bezinden klonlanması ise ilk kez 1996 yılında Reppert ve ark tarafından gerçekleştirilmiştir (21). Bu gelişme üzerine MT1 ve MT2 reseptörleri üzerine çalışmalar, sirkadiyen döngünün farklı saatlerinde, farklı dokularda ve farklı deney hayvanlarında yapılmış ve reseptörlerin özellikleri üzerinde çok farklı ve karmaşık mekanizmaların rol oynadığı öne sürülmüştür. Hipofiz bezinin pars tuberalis hücrelerinde varlığı gösterilen melatonin reseptörlerinin uzun süreli melatonine maruz kalması durumunda adenilat siklaz sensitivitesini artırdığı ve hücre kültüründe reseptörlerin down-regülasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (85). 1998’de Witt-Enderby ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada (86), fizyolojik melatoninin Çin Hamster overlerinde hazırlanan rekombinant insan MT1 reseptörü

üzerinde cAMP ve proteinkinaz A aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Melatonin reseptörlerinin G_i adı verilen inhibitör tipte G protein aracılı reseptörler olduğu bilinmektedir. Bu nedenle çalışmada, melatoninin G_i proteinleri aracılığı ile cAMP sentezini inhibe ettiği ve proteinkinaz A aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Hücre kültürleri sırasıyla 1 saat ve 16 saat süre ile 200pM melatonine maruz bırakılmış ve proteinkinaz A aktivitesinin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Aynı hücrelerde kısa süreli melatonin uygulaması cAMP bağımlı sinyal iletimini de inhibe etmiştir. Ayrıca cAMP ikincil haberci sisteminin süpersensitizasyonuna yol açmıştır. cAMP kaskadına bağlı süpersensitizasyon gelişimi diğer G_i reseptör aracılı iletimlerde de gösterilmiştir (87,88). Daha sonra ise melatonin reseptörleri için agonist ve antagonistlerin belirlendiği çalışmalar yapılmıştır.

MT1 ve MT2 reseptörlerinin agonist ve antagonistlerini aydınlatan ve melatonin reseptör ilişkisini gösteren çalışmada, melatoninin radyoaktif ligandı kullanılarak, reseptöre bağlanma derecesi incelenmiştir. Bu çalışmada MT1 reseptörüne radyoaktif ligandın daha kısa sürede bağlanarak dengeye ulaştığı (30dk), MT2 reseptörü için ise bu sürenin daha uzun olduğu (60dk) gösterilmiştir. Bu da farklı agonist ve antagonistlere karşı MT1 ve MT2 reseptörlerinin afinitelerinin de farklı olduğunu göstermektedir (89).

Ayrıca, pinealektomize yapılan hamsterlerde SCN ve pars tuberaliste MT1 reseptörü mRNA ekspresyonu ve reseptör dansitesi ölçülmüştür (90). Gece içinde 1 saat ani ışık uyarısı MT1 mRNA ekspresyonunu artırmıştır ancak bu hamsterler pinealektomize edildikleri için oluşan bu etkinin melatoninin plazma konsantrasyonundan bağımsız olarak, farklı bir mekanizma ile yürütüldüğü öne sürülmüştür. Ayrıca pars tuberaliste MT1 reseptör dansitesinin de arttığı gösterilmiş ancak bu artış ışık uygulamasının ardından 3 saat içinde eski değerlerine ulaşmıştır. Ancak hamster ve sıçanlarda melatonin reseptörlerinin düzenlenmesi farklılıklar göstermektedir (91, 92). Hamsterlarda görülen bu etki, melatoninden bağımsız iken, sıçanlarda melatonin reseptörlerinin regülasyonu plazma melatonin düzeyi ile kontrol edilmektedir (93). Ayrıca bu çalışmada plazma melatonin düzeyinden bağımsız olan bu etkinin mekanizması araştırılmış ve intergenikulat yolak kesildiğinde bu etkinin de ortadan kalkması nedeniyle hamsterlarda plazma melatonin düzeylerinden bağımsız intergenikulat yolakla düzenlenen bir mekanizmanın rol aldığı öne sürülmüştür.

Sıçanlarda yapılan çalışmada ise (93), pars tuberalisteki MT1 reseptörü üzerine in vivo melatoninin etkilerini incelemiştirlerdir. Bu çalışmada pars tuberaliste gece gündüz

döngüsü esnasında önemli değişiklikler olduğunu ancak pinealektomize edilen sıçanlarda bu etkilerin ortadan kalktığını gözlemlemiş ve sıçanlarda MT1 reseptörlerinin ekspresyonunun plazma melatonin düzeyleri ile yakından ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Ancak sıçanlar ve hamster hücrelerindeki melatonin reseptörleri üzerine melatoninin etkileri desensitizasyon açısından aynı özelliktedir. Bu nedenle çalışmamızda, plazma melatonin düzeylerinin in vivo olarak değiştirilebildiği sirkadiyen ritim değişikliklerinde pineal bezde MT1 ve MT2 reseptörlerine ait mRNA ekspresyonları değerlendirilmiştir.

Melatonin gece salgılandığı için melatonin reseptörleri her gün 8-16 saat süreyle melatoninin fizyolojik düzeylerine maruz kalmaktadır. Çin hamster overlerinden elde edilen hücre kültüründe 1µM melatonine 5 saat süreyle hücrelerin maruz bırakılması melatoninle indüklenen fosfoinositolün hidrolizinin tamamen kaybolması ile sonuçlanmıştır. Bu nedenle melatonine maruziyette gelişen desensitizasyonun mekanizmalarından birinin de inositol trifosfatın fosforilasyonu olabileceği öne sürülmüştür. Aynı hücrelerde kısa süreli (10dk) melatonin uygulaması, hücre kültüründe hazırlanan rekombinant insan MT2 reseptörlerinin desensitize olmasına ve internalize olmasına neden olmuştur ancak insan MT1 reseptörlerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (94).

Poirel ve ark. ise (95), sıçanlarda SCN'deki MT1 ve MT2 reseptörlerinin mRNA düzeylerindeki değişikliklerinin gün içinde gösterdiği değişiklikleri incelemişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalarda, melatonin reseptörlerinin dansitelerinin gün içindeki değişimleri gösterilmiştir (91,96,97). Ancak melatonin reseptör mRNA ekspresyonu ile ilgili çalışmalar, çelişkili sonuçlar vermiştir. Çalışmalardan birinde SCN MT1 mRNA ekspresyonunun gün içinde arttığı diğerinde ise gün içinde herhangi bir değişiklik olmadığı öne sürülmüştür (98,99). Poirel ve ark.'nın çalışmasında ise; MT1 mRNA ekspresyonunun gece saatlerinde en yüksek değerlerde olduğu bulunmuştur. Bunun nedeninin ise melatonin reseptörlerinin ekspresyonunun sirkadiyen ritimle düzenlenmesinde karmaşık bir feed-back mekanizmasına sahip olduğu öne sürülmüştür (95). Çalışmamızda da bu çalışmalara paralel sonuçlar elde edilmiştir. MT1 reseptörü için yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda; MT1 reseptörü 24/0s A/K grubunda kontrole göre 1.33f (f= ekspresyon faktörü) down-regüle olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak 0/24s A/K grubunda; MT1 reseptörlerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede up-regülasyon olduğu görülmüştür (p<0.001). Bu up-

regülasyon da oldukça yüksek bir katsayıya sahiptir (27.509). Bu da plazma melatonin düzeylerinin yüksek olduğu bu grupta pineal bezdeki MT1 reseptörlerinin mRNA ekspresyonunun önemli derecede arttığını göstermektedir.

Ayrıca sirkadiyen ritimde 16 saat ışık uygulaması MT1 reseptörü mRNA down-regülasyona (4.108f) neden olurken, 8 saat ışık uygulaması up-regülasyona (18.450f) neden olmuştur. Bu da sürekli aydınlık veya karanlık uygulanan gruplarda bulunan sonuçlarla paraleldir. Diğer bir ifade ile, 16/8s A/K grubunda da kontrole göre anlamlı derecede down-regülasyon olurken ($p<0.05$), 8/16 s A/K döngüsü uygulanan grupta MT1 reseptörleri up-regüle olmuştur ve bu artış istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p<0.001$). Sadece karanlık uygulanan grup olan 0/24s A/K grubundaki MT1 reseptörlerinin ise sırf aydınlık uygulanan grup olan 24/0s A/K uygulanan gruba göre istatistiksel olarak önemli derecede up-regüle (30f) olduğu bulunmuştur ($p<0.001$).

Bu sonuçlar da MT1 reseptörünün bir hafta süreyle karanlığa maruz kalan sıçanların pineal bezlerinde melatonin düzeylerinin yüksek olmasına bağlı olarak up-regüle olduğunu, ancak sürekli aydınlığa maruz bırakıldığında ise down-regüle olmak suretiyle melatonin hormonunun muhtemelen fizyolojik konsantrasyonunu ve pineal bezden salımını kontrol altına almak için geliştirdiği bir feed back mekanizması olabileceğini göstermektedir. Bunun muhtemel mekanizmasını ise şu şekilde açıklayabiliriz: Karanlıkta noradrenalinin pinealosit hücre zarında β_1 adrenerjik reseptörlere bağlanması sonucunda hücre içinde G_s aracılı cAMP sentezi tetiklenmekte ve bu cAMP serotoninden melatonin sentezini sağlayan AANAT aktivitesini tetiklemek suretiyle melatonin sentezini artırmaktadır. Ancak pinealosit hücre zarındaki melatonin reseptörlerinin aktive olması, G_i aracılı mekanizmalarla cAMP yapımını inhibe etmekte ve böylece AANAT enzimi aracılığıyla pinealosit hücrelerinde melatonin sentezi üzerine muhtemel bir kontrol mekanizması oluşturmaktadır. Melatonin sentezinin pinealosit hücre membranındaki bu muhtemel otopregülasyon mekanizması da ilk kez bu çalışma ile öne sürülmektedir.

Plazma melatonin düzeyleri açısından bu ilişki incelendiğinde ise bu muhtemel otoinhibisyon mekanizmasının sonuçları görülebilmektedir. Şöyle ki, gün içi ritimde plazma melatonin düzeyleri gece pik yaptığında 60-70pg/ml'ye ulaşmaktadır. Bu nedenle sürekli karanlığa maruz bırakılan grupta plazma melatonin düzeylerinin bu pik değerlerine yakın değerlerde olması beklenirken, ortalama $26,459 \pm 6,21$ pg/ml değerinde olduğu bulunmuştur. Bu da pinealosit hücre zarında bulunan melatonin

reseptörlerinin Gi reseptör aracılı cAMP inhibisyonu mekanizması ile plazma melatonin düzeylerinin bu düşük değerlerde dengelenmiş olabileceğini göstermektedir.

Aynı şekilde sırf aydınlığa maruz bırakılan grupta da, normal gün içi ritmindeki en düşük değerler olan 4-5 pg/ml'lik bir değer beklenirken, $9,789 \pm 1,41$ pg/ml düzeylerinde olduğu görülmüştür. Bu grupta ise uzun süreli olarak melatonin sentezinin az olması nedeniyle pinealosit hücre zarında melatoninin hücre içine girmesinin engellenmesi ve melatonin sentezini muhtemel otoinhibisyon mekanizması ile daha da azalmasını engellemek amacıyla reseptör ekspresyonunun azalmış olabileceği düşünülmektedir. Pinealosit hücresi içine melatonin alımının azaltılması, Gi aracılı melatonin inhibisyonunun önüne geçmede ve plazma melatonin düzeylerini belirli düzeylerde tutulmasında muhtemel bir otheregülasyon mekanizması geliştirmiş olabileceğinin göstermektedir.

Yapılan diğer çalışmalarda, MT1 ve MT2 rekombinant melatonin reseptörlerinin uzun süreli yüksek dozda melatonine maruz kalması durumunda desensitize olduğunun (100) gösterilmesinin ardından kısa süreli (10dk) $1\mu\text{M}$ melatonine maruz kalan rekombinant melatonin reseptörlerinden MT2 reseptörlerinin fonksiyonel olarak desensitize olduğu ancak MT1 reseptörlerinde önemli bir değişiklik olmadığı görülmüştür (94). Bu çalışmadan sonra, 8 saat süreyle fizyolojik dozun üzerinde melatonin uygulanması durumunda, Çin Hamster over hücre kültüründe hazırlanan rekombinant insan MT1 reseptörüne radyoaktif melatonin ligandının bağlanması ve melatonin reseptörlerinin afinitesi değerlendirilmiştir (101). Çalışmamızdaki sonuçlara paralel olarak, fizyolojik dozların üzerinde melatonin uygulaması MT1 reseptörlerinin sayısını artırmış ve stabilize etmiştir. Ancak afinite ve fonksiyonel sensitivitesini azaltmıştır. MT1 reseptörlerinin de melatonine olan afinitesindeki azalma melatonin reseptörünün desensitizasyonuna bağlıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda, melatonin reseptörünün desensitizasyon mekanizması cAMP akışının artması ile açıklanmıştır (100). Ancak bu çalışmada, MT1 reseptörünün desensitizasyonunda reseptör/G protein uncoupling mekanizmasının rol aldığı düşünülmektedir. Aynı zamanda fizyolojik melatonin düzeylerinin rekombinant MT1 reseptörleri üzerindeki etkilerinin gösterildiği ilk çalışma olan bu çalışmada, MT1 reseptörleri 8 saat süre ile fizyolojik melatonin düzeylerine maruz bırakıldığında, MT1 reseptör sayısının, afinitesinin ve fonksiyonel sensitivitesinin etkilenmediği görülmüştür (101).

Rekombinant MT2 reseptör sensitizasyonu üzerine yapılan ilk çalışma ise sıçan SCN'sinde fizyolojik melatonin düzeylerine bağlı MT2 internalizasyonunun zaman ve konsantrasyon bağımlı olduğu göstermiştir (102).

Bu çalışmada ise; yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, MT1 reseptör ekspresyonuna paralel sonuçlar elde edilmiştir. MT2 reseptörü 24/0s A/K grubunda kontrole göre down-regüle olsa da (1.17f) bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sadece karanlık uygulanan grup olan 0/24s A/K grubunda ise MT2 reseptörlerinde kontrol grubuna göre anlamlı derece up-regülasyon olduğu görülmüştür (2.88f, $p<0.05$). 16/8s A/K grubunda da kontrole göre anlamlı derecede down-regülasyon olurken (3.87f, $p<0.05$), 8/16 s A/K döngüsü uygulanan grupta MT2 reseptörleri up-regüle olmuştur ve bu artış istatistiksel olarak da önemlidir (5.41f, $p<0.05$). Sadece karanlık uygulanan grup olan 0/24s A/K grubundaki MT2 reseptörlerinin ise sırf aydınlık uygulanan grup olan 24/0s A/K uygulanan gruba göre istatistiksel olarak önemli derecede up-regüle olduğu bulunmuştur (3.66f, $p<0.05$).

MT2 reseptör ekspresyonu MT1 reseptör ekspresyonu ile paralel sonuçlar verse de, pineal bezde karanlığın etkisi ile fizyolojik melatonin düzeylerinin yüksek olduğu gruplarda (0/24 A/K ve 8/16) MT1 reseptöründeki mRNA ekspresyonu sırasıyla 27.509 f ve 18.454f artış gösterirken, MT2 reseptörü bu gruplarda sırasıyla 2.88 ve 5.41 f artış göstermiştir. Bu sonuçların da, diğer çalışmalara paralel olarak (82) sıçanlarda pineal bez melatonin reseptörlerinin ekspresyonunun farklı hız ve derecede gerçekleştiğinin göstergesi olduğu düşünülmektedir.

MT1 ve MT2 reseptörleri üzerine yapılan in vivo ve in vitro çalışmaların çoğu, fizyolojik melatonin konsantrasyonunun özellikle de MT1 reseptörünü negatif olarak regüle etmediğini göstermektedir (101). Ayrıca, Salinen ve ark. (82) ilk kez sıçanların farklı dokularında MT1 ve MT2 reseptör mRNA ekspresyonları üzerine gerçek zamanlı PZR teknolojisi ile yaptığı çalışmada gündüz ve gece saatlerinde, kalpte apekte ve sinoatrial (SA) düğümde, retinada, harderian bezde, hipotalamusta, karaciğerde ve ince bağırsaklarda reseptör ekspresyonunun farklı davranışlar izlediğini göstermiştir. MT1 reseptörleri, kalbin apeksinde ve SA düğümünde, retinada ve hipotalamusta melatonin düzeylerinin fazla olduğu gece saatlerinde down-regüle olurken, bunlardan sadece hipotalamustaki down-regülasyonun önemli derecede olduğunu göstermişlerdir. Ancak harderian bezde, karaciğerde ve ince bağırsakta MT1 reseptörleri istatistiksel açıdan önemli olmasa da up-regüle olmuştur. MT2 reseptörleri ile de gündüz ve gece

saatlerinde aynı dokularda benzer sonuçlar elde etmişler ve melatonin reseptörlerinin regülasyonunun farklı dokularda fonksiyonlarına göre farklı davranışlar gösterdiğini öne sürmüşlerdir. Çalışmamız da sıçan pineal bezinde melatonin reseptörlerinin regülasyonunun uzun süreli fizyolojik melatonin düzeylerinin değiştirilmesi ile negatif olarak regüle olmadığını gösteren ilk çalışma olma özelliğindedir.

Bu çalışmada ayrıca, uzun süreli değiştirilen plazma melatonin düzeylerinin beyin ve göz dokusunda mitokondrilerdeki elektron transport zincirindeki oksidatif mekanizmalar üzerine etkileri incelenmiştir. Daha önceden bilindiği gibi, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemi-reperfüzyon hasarı, enflamasyon, sistik fibrozis, kanser, tip 2 diyabet, Parkinson ve Alzheimer hastalıkları gibi birçok hastalığın patojenezinde oksidatif hasarın özellikle de mitokondrilerde meydana gelen oksidatif hasarın önemli rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (44, 103). Oksidatif hasar ise fazla miktarda oluşan reaktif oksijen ve nitrojen partiküllerinin DNA, proteinler, lipidler ve enzimler başta olmak üzere birçok biomolekülle etkileşerek fonksiyonlarını bozmalarından kaynaklanmaktadır. Biyolojik sistemler bu partiküllerin verdiği toksisiteye karşı GSH-Px, SOD, CAT gibi bir takım antioksidan enzimler ve E vitamini, C vitamini, melatonin gibi antioksidan moleküllere sahiptirler (47).

Mitokondrilerde ise reaktif oksijen partikülleri genellikle Kompleks I ve Kompleks III aktivitesi sırasında oluşabilir. Mitokondrilerdeki en önemli reaktif oksijen partikülleri arasında $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 gelir.

Mitokondrilerde temelde iki önemli $O_2^{\bullet-}$ kaynağı bulunmaktadır. Bunlar Kompleks I (104) ve Kompleks III (105)'tür. Ancak bu reaktif oksijen partikülü kaynakları buldukları dokuya göre farklılık gösterir. Örneğin kalp ve akciğer mitokondrisinde $O_2^{\bullet-}$ 'nin çoğunun Kompleks III kaynaklı olduğu (105), beyinde ise Kompleks I kaynaklı olduğu (104) gösterilmiştir.

Kompleks I'den kaynaklanan $O_2^{\bullet-}$ zarlar arası boşluğa değil, matrikse gönderilir (51,52) ve burada matrikse ait antioksidan enzimlerle inaktive edilirler (106). Kompleks III aktivitesi sırasında Q döngüsü esnasında ubikinonun otooksidasyonu sonucunda $O_2^{\bullet-}$ oluşabilir (107). Bu kompleks iki merkeze sahiptir. Bunlardan Q_0 zarlara arası boşluğa yakın, Q_i ise matrikse yakın bölgede yerleşmiştir (51). Q_0 merkezinden üretilen $O_2^{\bullet-}$ zarlar arası boşluğa, Q_i merkezinden üretilen $O_2^{\bullet-}$ ise matrikse gönderilir.

Bunlardan $O_2^{\bullet-}$ matrikste MnSOD tarafından, zarlar arası boşlukta ise CuZnSOD tarafından detoksifiye edilir. Oluşan H_2O_2 ise GSH-Px enzimi aracılığı ile suya dönüştürülmektedir (108-110). Zarlar arası antioksidan mekanizmalarla yakalanamayan $O_2^{\bullet-}$ molekülleri ise sitozole geçerlerse sitozolik CuZnSOD tarafından detoksifiye edilmektedir.

Glutatyona bağlı sistemler ise özellikle sitozoldeki en önemli redoks tamponlarıdır (108,110). Mitokondriler gibi bazı organeller de üstlendikleri görev nedeniyle kendi GSH havuzlarına sahiptir ve burada SOD enzimi ile koopere şekilde işlev görürler.

Matrikste MnSOD aktivitesinin H_2O_2 uzaklaştıran enzimlerle bir denge içinde olması gerekmektedir. Matriks GSH redoks döngüsü ve MnSOD koordinasyonu H_2O_2 akışının fazla olmasının engellenmesi açısından oldukça önemlidir. Çünkü eğer bu oluşum engellenemezse oksidan potansiyeli çok daha yüksek olan $\bullet OH$ radikallerinin oluşumu kaçınılmazdır (47). Bu nedenle çalışmamızda, beyin ve göz dokusuna ait mitokondrilerinde serbest oksijen radikallerinin ilk oluşum yerlerinden birisi olan matrikste görev alan MnSOD ve GSH-Px aktiviteleri değerlendirilmiştir.

E Vitamini, β -karoten, flavanoidler (111), C Vitamini (112), ürik asit (108) hücrelerdeki ve mitokondrilerdeki antioksidan savunma sistemine ait diğer moleküllerdir. Ubiquinol (UQH_2) de mitokondrial zarları lipid peroksidasyonundan koruyan önemli bir antioksidandır (113). Melatonin de son zamanlarda antioksidan özellikleri üzerine oldukça fazla çalışma yapılmış, sentezi sirkadiyen ritim gösteren doğal bir antioksidan hormondur. Melatoninin farmakolojik dozlarının mitokondriler üzerindeki antioksidan etkileri ise ilk kez Martin ve ark. tarafından gösterilmiştir (58).

Melatoninin mitokondrial homeostazisi etkileyip etkilemediği ilk kez 2000 senesinde Martin ve ark. tarafından yapılan in vivo çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada sıçanlara 10mg/kg dozunda melatonin enjekte edilmiş ve uygulamadan sonra belli zaman aralıkları ile dekapite edilerek, beyin ve karaciğer dokularından elde edilen mitokondrilerde elektron transport zinciri enzimlerinin aktiviteleri ölçülmüştür. Bu şartlarda melatonin Kompleks I ve Kompleks IV aktivitelerini zamana bağlı olarak artırırken, Kompleks II ve Kompleks III üzerine etkili olmamıştır. Melatoninin etkileri enjeksiyonu takiben ilk 30 dk.'nın sonunda görülmeye başlamış ve 120-180 dk içinde komplekslerin aktiviteleri normal değerlerine ulaşmıştır. Bu veriler ise melatoninin yarılanma ömrü ile uyumlu sonuçlardır (57).

Bu çalışma ile melatoninin mitokondrial elektron transport zincirinde görev alan kompleksler üzerine etkilerinin görülmesinin ardından aynı çalışmada mitokondriler içine Ca^{+2} girişini engelleyen ve bu mekanizma ile bazı mitokondrial enzimleri inaktive eden rutenyum kırmızısının etkilerini ve bu etkilerin farmakolojik dozda uygulanan melatonin ile ilişkisini incelemişlerdir. In vivo rutenyum uygulanmasından sonra beyin ve karaciğer dokularına ait Kompleks I ve Kompleks IV aktivitelerinin yanı sıra GSH-Px aktivitesi de inhibe olmuştur. Rutenyum kırmızısı ile görülen bütün bu etkiler 10mg/kg melatonin ile önemli derecede düzelmiştir (57). Bu çalışma melatonin ile mitokondrial antioksidan savunma sistemi arasındaki ilişkiyi gösteren ilk çalışma olmuştur. Çalışmamızda ise, beyin ve göz dokusunda oksidatif strese bağlı olarak enzim aktiviteleri üzerinde meydana gelen değişikliklerde fizyolojik melatonin düzeylerindeki değişikliklerin etkileri incelenmiştir. Bu çalışma fizyolojik melatonin düzeylerinin mitokondrilerdeki antioksidan savunma mekanizması üzerine etkilerini gösteren ilk çalışma özelliğindedir.

Melatoninin mitokondrilerdeki antioksidan etkileri, diğer antioksidanlarla karşılaştırılmıştır. Bu konuda ilk yapılan çalışmada, beyin ve karaciğer mitokondrilerinde oksidatif stres ter-butyl hidroperoksit (t-BHP) ile inkübe edilmek suretiyle tetiklenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar t-BHP'nin GSH-Px ve GRD enzimlerinin aktivitelerini inhibe ettiğini göstermiştir (114). Mitokondrilere, t-BHP uygulanmaksızın 100nM melatonin uygulandığında GSH içeriği önemli derecede artmış, GSSG içeriği azalmıştır. t-BHP uygulaması ise GSH-Px ve GRD aktivitelerini inhibe etmiştir. 100nM melatonin bu enzimlerin düzeylerini normal kontrol değerlerine ulaştırmıştır. Bunun da ötesinde melatoninin antioksidan etkileri E vitamini ve C vitamini gibi diğer antioksidanlara kıyasla oldukça yüksek bulunmuştur (58).

Bu çalışmada da melatoninin fizyolojik düzeylerinin mitokondrial GSH-Px aktivitesi üzerindeki etkileri incelendiğinde; beyin dokusu homojenatından izole edilen mitokondrilerde GSH-Px aktivitesi, A/K döngüsü değiştirilen bütün gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Bu gruplardan özellikle de 8/16 s A/K döngüsü uygulanan grupta bu artış çok daha önemlidir ($p<0.001$). Bu sonuçlar da farklı aydınlık / karanlık döngüsüne maruz kalındığında beyin hücreleri mitokondrilerindeki H_2O_2 moleküllerinden kaynaklanan hasarın önlenmesinde antioksidan savunma sistemini oluşturan GSH-Px önemli bir rol oynadığını göstermektedir. 0/24s, 8/16 s, 16/8 s ve 24/0s A/K uygulanan gruplar

arasında ise istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Göz dokusu homojenatından izole edilen mitokondrilerde ise GSH-Px aktivitesi, 0/24 s ve 8/16 s A/K döngüsü uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir artış olmuştur ($p < 0.05$).

Melatoninin mitokondrilerde homeostazisi sağladığı üzerine yapılan diğer bir çalışmada, siyanid ile oluşturulan oksidatif hasarda sub-mitokondrial partiküllere melatoninin etkileri incelenmiş, melatoninin ETZ'ne ait komplekslerinin aktivitelerini artırdığı ve ATP sentezini kolaylaştırdığı gösterilmiştir (57). Ayrıca melatoninin yüksek redoks potansiyeline (-94V) sahip olması nedeniyle kompleks I için elektron donörü olarak görev yapabileceği ve mitokondrial antioksidan sisteme bu şekilde katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Martin ve ark. yaptıkları çalışmada (59), melatoninin Kompleks I ve Kompleks IV aktivitesini sadece antioksidan olarak değil, bu moleküllerle birlikte etkileşerek de sağladığını öne sürmüşlerdir. Bu etkileşimi, BN-PAGE adı verilen histokimyasal yöntemle göstermişler ve mekanizmasının melatoninin redoks potansiyelinin yüksek olmasına bağlı olarak gerçekleştirdiğini öne sürmüşlerdir. Aynı çalışmada, Kompleks IV aktivitesini inhibe eden siyanid kullanmışlar ve kısmen inhibe olmuş Kompleks IV aktivitesini melatoninin %50 gibi yüksek bir oranda artırdığını göstermişlerdir. Ancak, Kompleks IV'ün tamamen inhibe edilmesi durumunda melatoninin 5mM gibi yüksek dozlarının bile aktiviteyi etkileyemediğini görerek, melatoninin aktif formda olan Kompleks IV üzerine aktivitesini geliştirici yönde yardımcı olduğunu ancak, tamamen inaktif hale gelmiş Kompleks IV aktivitesini düzeltemediğini gözlemlemişlerdir. Melatoninin ETZ'ndeki komplekslerle arasındaki bu ilişkilerin ise, bu komplekslerin aktivitelerinde herhangi bir aksaklık durumunda oksidatif hasara yol açabileceğini ve bu durumda da hücreyi apoptozise götüren olayların tetiklenebileceği göz önüne alınırsa, oldukça önemli bir rolü üstlenmiş olabileceği düşünülmektedir.

Bu nedenle çalışmamızda melatoninin beyin ve göz dokusundaki oksidatif hasarın engellenmesinde melatoninin fizyolojik düzeylerinin rolü araştırılmıştır. Çalışmada GSH-Px aktivitesinin yanı sıra mitokondrial MnSOD enzim aktiviteleri de değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda ise; beyin dokusu homojenatından izole edilen mitokondrilerde Mn-SOD aktivitesi değerlendirildiğinde, 0/24 ve 24/0 s A/K siklusu uygulanan gruplarda anlamlı derecede azalma olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). 8/16 ve 16/8 s A/K siklusu uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik bulunmamıştır. Bu sonuçlar da Mn-SOD enziminin GSH-Px

enzimi ile antioksidan savunma sisteminde öncelikleri farklı olan ve dengeleyici bir rol oynayabileceğinin göstergesidir. Kontrol grubu, 8/16 s ve 16/8 s A/K uygulanan gruplarda ise istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır. Göz dokusu homojenatından izole edilen mitokondrilerde Mn-SOD aktivitesi 0/24s ve 8/16 s A/K döngüsü uygulanan, gruplarda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). Gözde mitokondrial antioksidan enzimlerinden elde edilen sonuçlar, beyindeki mitokondrial antioksidan enzimlerle benzer özellikler göstermiştir.

Melatoninin oksidatif hasara bağlı apoptozisi engelleme yollarından bir diğeri de mitokondrial geçiş poru (MTP) üzerine olan etkileridir. Apoptozisteki en önemli yollardan biri mitokondrial membran permeabilizasyonu (MMP) adı verilen membran geçirgenliğinin artmasına bağlı gelişen reaksiyonlar dizisidir. Bu membran geçirgenliğinin artmasının başlıca nedeni iç mitokondri zarında bulunan MTP'nin matrikstekki Ca^{+2} akışının artmasına bağlı olarak açılmasıdır. MTP'nin Ca^{+2} 'ye olan ilgisinin artmasında rol oynayan en önemli faktörlerden biri oksidatif stres ve buna bağlı olarak gelişen ATP yetmezliğidir. Melatoninin dejeneratif hastalıklarda hücreleri apoptozisten koruyucu etkilerinin antioksidan özelliği ve serbest radikalleri yakalayıcı etkileri ile gösterdiği düşünülürken, son çalışmalar bu etkinin MTP ile doğrudan etkileşmesi sonucu geliştiğini göstermiştir (115). Buna ilaveten Jou ve ark'nın yaptığı çalışmalar da melatoninin sıçan beyin astrositlerindeki koruyucu etkilerini yine benzer bir mekanizma ile gerçekleştirdiğini ve özellikle de maternal olarak anneden geçen melatoninin fetusta bu düzenlemeyi sağlayarak fetus beyin astrositlerinin apoptozise uğramasını engellediğini göstermişlerdir (116,117).

Melatoninin daha önce gösterilmiş bir diğeri etkisi ise zarları stabilize edici özelliğidir. Bu konuda daha önce yaptığımız çalışmalarda, melatoninin sepsiste artan oksidatif hasarda eritrosit zarında koruyucu etkileri gösterilmiş ve in vivo ortamda melatoninin farmakolojik dozlarının eritrosit zarını lipid peroksidasyonundan ve oksidatif hasardan koruduğu ve antioksidan savunma sistemindeki enzimlerin aktivitelerini artırdığı bulunmuştur (118,119). Ayrıca in vitro ortamda da melatoninin eritrositlerin zarında sodyum nitroprussid uygulamasına bağlı olarak artan NO düzeylerinin oksidan etkisini önleyici yönde etkilerinin olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda bu in vivo ve in vitro deneylerde, birçok hastalığın patojenezinde ve fizyolojik doku perfüzyonunda oldukça önemli olan eritrositlerin deformabilite özelliklerinin de melatonin uygulaması ile antioksidan özelliklerinin aracı olduğu mekanizmalarla düzelttiği öne sürülmüştür.

Melatoninin hücre zarlarını stabilize edici özelliğinin yanı sıra mitokondrial zarları da stabilize edici özelliklerinin olduğu gösterilmiştir. Lipofilik özellikte olması nedeniyle özellikle de mitokondrial iç zarı stabilize ederek ETZ'nin fonksiyonunu gerektiği gibi yapabilmesine yardımcı olmaktadır (120).

Melatoninin zarlar üzerindeki etkileri dikkate alınarak, bu çalışmada da farklı sirkadiyen ritimlere tabi tutulmuş sıçanların eritrositlerinde fizyolojik melatonin düzeyindeki değişikliklerin antioksidan savunma sistemini nasıl etkilediği ve lipid peroksidasyonunun bu değişikliklerden nasıl etkilendiği de değerlendirilmiştir.

Melatoninin farmakolojik dozlarının eritrositlerde oksidatif hasar ile artan GSH-Px aktivitesini daha da fazla tetiklediği bilinmektedir (121). Bu çalışmada da, oksidatif hasarın bir göstergesi olarak sirkadiyen ritmi değiştirilmiş bütün gruplarda eritrositlerde GSH-Px aktivitesi, kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$).

GSH-Px aktivitesinin özellikle de H_2O_2 'i ortamdan uzaklaştırmak suretiyle etki gösterdiği düşünülerek, aynı oksidan molekülü ortamdan uzaklaştırmakla görevli bir diğer enzim olan CAT aktivitesi de değerlendirilmiştir. Eritrositlerde katalaz (CAT) aktivitesi, 0/24 s A/K döngüsü uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken ($p < 0.05$), 24/0 s A/K uygulanan grupta herhangi önemli bir değişiklik görülmemiştir. 8/16 s ve 16/8 s A/K döngüsü uygulanan gruplarda ise katalaz aktivitesinde kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli bir azalma olmuştur ($p < 0.05$). Ayrıca bu gruplarda katalaz aktivitesindeki azalma 0/24 s A/K grubuna göre azalma da istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$ ve $p < 0.001$). Son olarak, 16/8 s A/K döngüsüne tabi tutulan gruptaki azalma 24/0 s A/K uygulanan gruba göre de önemlidir ($p < 0.05$). Bu sonuçlar plazma melatonin düzeylerinin yüksek olduğu 0/24 s A/K döngüsü uygulanan grupta katalaz aktivitesinin melatonin ile tetiklenmiş olabileceğini göstermektedir. Ancak 24/0 grubunda yine katalaz aktivitesinin 8/16 ve 16/8 s A/K döngüsü uygulanan gruplara göre fazla olması bu grupta olası bir oksidatif hasarın göstergesidir. Melatoninin antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı, özellikle de GSH-Px enzim aktivitesini enzimin sentezini genetik olarak artırmak suretiyle artırdığı daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (121). Ancak CAT aktivitesi üzerine olan etkileri tartışmalıdır. Çünkü yapılan çalışmalardan bir kısmı (122,123) farmakolojik melatonin düzeylerinin CAT aktivitesini de tetiklediğini göstermiş, bir kısmı ise (124-126) H_2O_2 'i yakalayabilme özelliği olan melatoninin (116)

in vivo ortamda katalaz ile yarışa girerek kompetatif bir inhibisyona CAT aktivitesini azaltabileceğini göstermiştir. Bu nedenle melatoninin CAT enziminin genetik ekspresyonu üzerine etkili olup olmadığı üzerine çalışmaların yapılması ve CAT enzimi ile melatonin arasındaki ilişkilerin aydınlatılması gerekmektedir.

Diğer taraftan, H_2O_2 'in ortamdan uzaklaştırılmasında GSH-Px aktivitesi ve CAT aktivitesi arasındaki ilişki göz önüne alındığında, GSH-Px aktivitesinin 8/16 saat A/K döngüsü uygulanan grupta 16/8 saat A/K döngüsü uygulanan gruba göre düşük olması, ve bu gruplarda CAT aktivitesi açısından tam tersi bir davranış görülmesi; eritrositlerde oksidatif hasara yol açan önemli oksidanlardan olan H_2O_2 'in ortamdan uzaklaştırılmasında bu iki enzimin muhtemelen birbirinin aktivitesini dengeleyici özellikte olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar melatoninin farmakolojik dozlarında elde edilen sonuçlarla da paralellik göstermektedir (124-126).

Eritrosit zarındaki lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondelaldehit düzeyleri değerlendirildiğinde, en fazla MDA düzeyinin 8/16 s A/K döngüsü uygulanan grupta olduğu görülmüştür. Bu gruptaki MDA düzeyindeki değişiklikler kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış ancak 0/24 ($p<0.05$) ve 24/0 ($p<0.01$) gruplarına göre önemli derecede yüksek bulunmuştur.

Eritrosit zarındaki değişikliklerin değerlendirmeleri; sirkadiyen ritim değişikliklerinin eritrositlerde önemli oksidatif hasara yol açtığını, özellikle de 8/16 ve 16/ 8 saat aydınlık / karanlık döngüsü uygulanan gruplarda bu değişikliklerin daha önemli olduğunu göstermiştir. MDA düzeyinin yine en fazla 8/16 saat A/K döngüsü uygulanan grupta fazla olması bu ışık döngüsünün eritrositlerdeki oksidatif hasar açısından kritik bir düzenleme olabileceğinin göstergesidir.

Fizyolojik melatonin düzeylerinin pineal bez reseptör ekspresyonu üzerine ve mitokondrial antioksidan enzimler üzerine etkilerinin ilk kez gösterildiği bu çalışma sonucunda, pineal bezde melatonin reseptörlerinin regülasyonunun birçok farklı mekanizmanın bir arada görev aldığı bir sistemle yürütüldüğü, uzun süreli yüksek melatonine maruz kaldığında up-regüle olduğu ve melatonin sentezinin baskılandığı sürekli aydınlık uygulanması durumunda ise down-regüle olduğu gösterilmiştir. Beyin ve göz dokusundan izole edilen mitokondrilerde ise plazma melatonin düzeylerindeki değişikliklere bağlı olarak antioksidan enzimlerden GSH-Px ve MnSOD aktivitelerinin de değiştiği gösterilmiştir. Ayrıca eritrositlerde oksidatif stresin göstergesi olan lipid

peroksidasyonu ve bu hasarın önlenmesinde görevli olan enzimlerden GSH-Px ve CAT aktiviteleri de değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak;

- Sirkadiyen ritim döngüsünün bir hafta süre ile değiştirilmesi, plazma melatonin düzeylerini etkilemiştir. Plazma melatonin düzeyleri karanlığa maruz kaldıkça kontrol grubuna ve sürekli aydınlık uygulanan gruba göre önemli derecede artmıştır.
- Pineal bezde MT1 ve MT2 reseptörlerinin ekspresyonlarının fizyolojik melatonin düzeylerindeki değişikliklerle nasıl etkilendiğini ilk kez gösteren bu çalışmada, plazma melatonin düzeylerinin artması, MT1 ve MT2 reseptörlerine ait mRNA ekspresyonunu up-regüle etmiş, azalması ise down-regülasyonuna neden olmuştur. Bu nedenle plazma melatonin düzeylerinin pineal bezde melatonin reseptörlerinin regülasyonu aracılığı ile muhtemel bir otopregülasyon mekanizması ile dengede tutulmaya çalışıldığını göstermektedir.
- Beyin dokularından izole edilen mitokondrilerde antioksidan savunma sistemi üzerine fizyolojik melatonin düzeylerinin etkileri incelendiğinde; oksidatif hasara karşı antioksidan savunma mekanizmalarının tetiklendiğinin göstergesi olarak, sirkadiyen ritim değişikliklerinin GSH-Px aktivitesini bütün gruplarda normal 12/12 saat gün ışığı alan kontrollere göre önemli derecede artırdığı gözlenmiştir.
- Göz dokularından izole edilen mitokondrilerde de GSH-Px aktivitesi bütün gruplarda kontrol grubuna göre beyindeki sonuçlarına paralel olarak artmıştır.
- Beyin dokusu mitokondrilerinde MnSOD aktivitesi, sirkadiyen ritim değişiklikleri ile azalmıştır. Bu azalma özellikle de sürekli aydınlık ve sürekli karanlık uygulanan gruplarda daha önemlidir.
- Göz dokusu mitokondrilerinde de MnSOD aktivitesi, sirkadiyen ritim değişiklikleri ile önemli derecede azalmıştır. Bu azalma özellikle 8/16 s A/K döngüsü uygulanan grupta daha belirgindir.
- Eritrositlerde de sirkadiyen ritim değişiklikleri GSH-Px aktivitesinin artması ile sonuçlanmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Cassone MV. The clocks tell the time. *Nature Neuroscience* 2005; 8(1): 3
2. Lee Kavanau J. Biological time-keeping mechanisms: A need for broader perspectives? *Med Hypotheses*. 2006 Jul 21; [Epub ahead of print]
3. Korf HW, Von Gall C, Stehle J. The circadian system and melatonin: lessons from rats and mice. *Chronobiol Intern* 2003; 20(4): 697-710
4. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in human. *Acta Biochimica Polonica* 2003; 50(4): 1129-1146
5. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 17(2): 273-285.
6. Schibler Ueli. The daily rhythms of gens, cells and organs. *EMBO reports* 2005; 6: 9-13
7. Okamura H. Circadian and seasonal rhythms: Integration of mammalian circadian clock signals from molecule to behavior. *J Endocrinol* 2003; 177; 3-6
8. Aschoff J. The phase-angle difference in circadian periodicity. In: "Circadian Clocks", J. Aschoff eds, North Holland Press, Amsterdam, 1965, ss 262–278
9. Zhang J, Dong X, Fujimoto Y, Okamura H. Molecular signals of mammalian circadian clock. *Kobe j Med Sci* 2004; 50(4); 101-109
10. Bunney, W.E., Bunney, B.G. Molecular Clock genes in Man and Lower Animals: Possible Implications for Circadian Abnormalities in Depression. *Neuropsychopharmacology* 2000; 22(4): 335-345

11. Earnest DJ, Liang FQ, Ratcliff M, Cassone VM. Immortal time: circadian clock properties of rat suprachiasmatic cell lines. *Science*. 1999; 283(5402): 693-695.
12. Masson-Pevet M, Bianchi L, Pevet P. Circadian photic regulation of melatonin receptor density in rat suprachiasmatic nuclei: comparison with light induction of fos-related protein. *J Neurosci Res* 1996; 43(5): 632-637.
13. Stanewsky R. Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res* 2002; 309:11-26
14. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, in the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587-2592
15. Macchi MM, Bruce JN. Human physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinol* 2004; 25: 177-195
16. Guyton AC, Hall JE. *Text Book of Medical Physiology (Tıbbi Fizyoloji)*. Çavuşoğlu H (Çev. Ed.), 9. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, İstanbul 1996, ss 1015-1016
17. Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1980;1: 109-131
18. Hardeland R, Pandi-Perumal SK, Cardinali DP. Molecules in focus: Melatonin. *Intern J Biochem Cell Biol* 2006; 38; 313-316
19. Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 1991;79: C153-C158
20. Von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 2002; 309(1): 151-62
21. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD; Kolakowski LF. Cloning of melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett* 1996; 386: 219-224
22. Turek FW, Gillette MU, Melatonin, sleep and circadian rhythms: rationale for development specific melatonin agonists. *Sleep Medicine* 2004; 5: 523-532
23. Reiter RJ. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochem Int* 1995; 27(6): 453-60
24. Benites-King G, Anton-Jay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effect. *Experientia* 1993; 49: 635-641
25. Brezezinski A. Melatonin in humans. *N English J Med* 1997; 336: 186-195
26. DawsonD, Encel N. Melatonin and sleep in humans. *J Pineal Res* 1993; 15: 1-12
27. Dijk DJ, Von Schantz M. Timing and consolidation of human sleep, wakefulness, and performance by a symphony of oscillators. *J Biol Rhythms* 2005; 20(4): 279-290

28. Cauhallo A, Ritshel WA. Pharmacokinetics of melatonin in human sexual maturation. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1882-1886
29. Cos S, Gonzalez A, Martinez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C, Sanchez-Barcelo EJ. Estrogen-signaling pathway: A link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detect Prev* 2006; 30(2): 118-128
30. Balik A, Kretschmannova K, Mazna P, Svobodova I, Zemkova H. Melatonin action in neonatal gonadotrophs. *Physiol Res* 2004; 53 Suppl 1: S153-166
31. Poeggeler B. Melatonin, aging, and age-related diseases: perspectives for prevention, intervention, and therapy. *Endocrine* 2005; 27(2): 201-212
32. Olakowska E, Marcol W, Kotulska K, Lewin-Kowalik J. The role of melatonin in the neurodegenerative diseases. *Bratisl Lek Listy* 2005; 106(4-5): 171-174
33. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005; 27(2): 189-200
34. Muller-Wieland D, Behnke B, Koopmann K, Krone W. Melatonin inhibits LDL receptor activity and cholesterol synthesis in freshly isolated human mononuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203 (1): 416-421
35. Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vivo. *Free Radical Biol Med* 1996; 21: 307-315
36. Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR. Melatonin, a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 419-420
37. Reiter RJ, Carneiro RG, Oh S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997; 29: 363-372.
38. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993; 1: 57-60
39. Jacob S, Poeggeler B, Weishaupt JH, Sirén A-L, Hardeland R, Bähr M, Ehrenreich H. Melatonin as a candidate compound for neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): High tolerability of daily oral melatonin administration in ALS patients. *J Pineal Res* 2002; 33: 186-187
40. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994; 55: PL271-PL276
41. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci* 1994; 55: PL455-PL460

42. Blanchard B, Pompon D, Ducrocq C. Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxyxynitrite. *J Pineal Res* 2000; 29: 184-192
43. Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS. *Human Physiology (İnsan Fizyolojisi)*. Kaymak K (Çev. Ed.), 6. Baskı, Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı 1997, ss 42-52
44. Champe PC, Harvey RA. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry (Biyokimya)*. Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E (Çev. Ed.), 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, İstanbul 1997, ss 66-72
45. Guyton AC, Hall JE. *Text Book of Medical Physiology (Tıbbi Fizyoloji)*. Çavuşoğlu H (Çev. Ed.), 9. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, İstanbul 1996, ss 860-861
46. Venarucci D, Venarucci V, Vallese A, Battila L, Casado A, De la Torre R, Lopez Fernandez ME. Free radicals: important cause of pathologies refer to ageing. *Panminerva Med* 1999; 41(4): 335-339
47. Jezek P, Hlavata L. Mitochondria in homeostasis reactive oxygen species in cell, tissues and organism. *Intern J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 2478-2503
48. Sastre J, Pallardo FV, Vina J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life* 2000; 49(5): 427-435
49. Sastre J, Pallardo FV, Garcia de la Asuncion J, Vina J. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res* 2000; 32(3): 189-198
50. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 2004; 279: 49064-49073
51. Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of super oxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 2001; 353: 411-416
52. Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 2003; 278: 5557-5563
53. Genova ML, Pich MM, Biondi A, Bernacchia A, Falasca A, Bovina C et al. Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant. *Exp Biol Med* 2003; 228: 506-513
54. Kadenbach B. Intrindic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1604(2): 77-94
55. Yuan H, Pang SF. [¹²⁵I] Iodomelatonin binding sites in the pigeon brain: binding characteristics, regional distribution and diurnal variation. *J Endocrinol* 1991; 128(3): 475-482

56. Poon AM, Pang SF. 2[125I] Iodomelatonin binding sites in spleens of guinea pigs. *Life Sci* 1992; 50(22): 1719-1726
57. Martin M, Macias M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res* 2000; 28(4): 242-248
58. Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Acuna-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 2000; 14(12): 1677-1679
59. Martin M, Macias M, Leon J, Escames G, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in the rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34(4): 348-357
60. Mansouri A, Demeillieris C, Amsellem S, Pesayre D, Fromenty B. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart and skeletal muscle: protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Experimental Therapeutics* 2001; 298(2): 737-743
61. Milczarek R, Klimek J, Zelewski L. Melatonin inhibits NADPH-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *Hormones and Metabolism Researches* 2000; 32(2): 84-85
62. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and Mitochondrial Function. *Life Sciences* 2004; 75: 765-790
63. Acuna-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin mitochondria and cellular bioenergetics. *J Pineal R* 2001; 30: 65-74
64. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; 38: 1-9
65. Kunz D, Bes F. Melatonin as a therapy in REM sleep behavior disorder patients: an open-labeled pilot study on the possible influence of melatonin on REM-sleep regulation. *Movement Disorders* 1999; 14: 507-511
66. Sharman EH, Sharman KG, Ge YW, Lahiri DK, Bondy SC. Age-related changes in murine CNS mRNA gene expression are modulated by dietary melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36(3): 165-170
67. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350

68. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15: 532-537
69. Blaschke C, Hirschman L, Valencia A. Information extraction in molecular biology. *Brief Bioinform* 2002 Jun; 3(2): 154-165
70. Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods*. 2001; 25(4): 443-51
71. Simon N, Papa K, Vidal J, Boulamery A, Bluguerolle B. Circadian Rhythms of oxidative Phosphorilation: Effects of rotenone and melatonin on isolated rat mitochondria. *Chronobiol Intern* 2003; 20(3): 451-461
72. Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Nissim I. Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 Mar 14; 97(6): 2826-31
73. Flohe L, Gunzler WA. Assays for glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-121
74. Quick KL, Hardt JJ, Dugan LL. Rapid microplate assay for superoxide scavenging efficiency. *J of Neurosci Methods* 2000; 97 (2): 139-144.
75. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254
76. Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952; 95: 133-140
77. Luck H. Catalase. In: Bergmeyer HU (eds). *Methods of Enzymatic Analyses*. Verlag Chemie-GMBH, Weinheim, New York and Londo 1965, pp 885-894
78. Stocks J, Dormandy TL. The autooxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 1971; 20: 95-11
79. Dubocovich ML, Rivera Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* 2003; 8: d1093-108
80. Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Braz J Med Biol Res*. 1993; 26(11): 1141-55
81. Reiter RJ, Carneiro RG, Oh S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997; 29: 363-372
82. Salinnen P, Saarela S, Ilves M, Vakkuri O, Leppaluoto J. The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci* 2005; 76: 1123-1134

83. Reppert SM, Weaver DR, Rivkees SA, Stopa EG. Putative melatonin receptors in human biological clock. *Science* 1988; 242 (4875): 78-81
84. Dubocovich ML, Cardinalli DP, Guardiola-Lemaitre B, Hagan RM, Krause DN et al. Melatonin receptors. In: *The IUPHAR Compendium of receptor characterisation and classification*. London, IUPHAR Media. 1998: 187-193
85. Hazlerigg DG, Gonzalez-Brito A, Lawson W, Hastings MH, Morgan PJ. Prolonged exposure to melatonin leads to time dependent sensitization of adenylate cyclase and down-regulates melatonin receptors in pars tuberalis cells from ovine pituitary. *Endocrinology* 1993; 132: 285-292
86. Witt-Enderby AP, Masana MI, Dubocovich ML. Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human MT₁ melatonin receptor. *Endocrinology* 1998; 139: 3064-3071
87. Bates MD, Senogles SE, Bunzow JR, Liggett SB, Civelli O, Caron MG. Regulation of responsiveness at D₂ dopamine receptors by receptor desensitization and adenylyl cyclase sensitization. *Mol Pharmacol* 1991; 39: 55-63
88. Watt VJ, Neve KA. Sensitization of endogenous and recombinant adenylate cyclase by activation of D₂ dopamine receptors. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 966-976
89. Browning C, Beresford I, Fraser N, Giles H. Pharmacological characterization of human recombinant melatonin MT₁ and MT₂ receptors. *British J Pharmacol* 2000; 129: 877-886
90. Schuster C, Gauer F, Guerrero H, Lakhdar-Ghazal N, Pevet P, Masson-Pevet M. Photic regulation of MT₁ melatonin receptors in the Siberian Hamster pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei: Involvement of the circadian clock and intergeniculate leaflet. *J Neuroendocrinol* 2000; 12: 207-216
91. Gauer F, Masson-Pevet M, Stehle J, Pevet P. Daily variations in melatonin receptor density of pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain Res* 1994; 641: 92-98
92. Moore RY. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed Proc* 1993; 42: 2783-2789
93. Guerrero HY, Gauer F, Schuster C, Pevet P, Masson-Pevet M. Melatonin regulates the mRNA expression of the MT₁ melatonin receptor in the rat pars tuberalis. *Neuroendocrinol* 2000; 71: 163-169
94. Gerdin MJ, Masana MI, Ren D, Miller RJ, Dubocovich ML. Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT₁ and hMT₂ melatonin receptors. *J Pharmacol Experimental Therapeutics* 2003; 304: 931-939

95. Poirel VJ, Masson-Pevet M, Pevet P, Gauer F. MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 2002; 946: 64-71
96. Gauer F, Masson-Pevet M, Skene DJ, Viven-Roels B, Pevet P. Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei; evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself. *Neuroendocrinol* 1993; 57: 120-126
97. Masson-Pevet M, George D, Kalsbeek A, Saboureau M, Lakhdar-Ghazal N, Pevet P. An attempt to correlate brain areas containing melatonin binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. *Cell Tissue Res* 1994; 278: 97-106
98. Neu JM, Niles LP. A marked diurnal rhythm of melatonin ML1a receptor mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 49: 303-306
99. Sugden D, McArthur AJ, Ajpru S, Duniec K, Piggins HD. Expression of MT1 melatonin receptor subtype mRNA in the entrained rat suprachiasmatic nucleus: a quantitative RT-PCR study across the diurnal cycle. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 72: 176-182
100. MacKenzie RS, Melan MA, Passey DK, Witt-Enderby PA. Dual coupling of MT1 and MT2 melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 587-595
101. Gerdin MJ, Masana MI, Dubocovich ML. Melatonin-mediated regulation of human MT1 melatonin receptors expressed in mammalian cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 2023-2030
102. Gerdin MJ, Masana MI, Rivera-Bermudez MA, Hudson RL, Earnest DJ, Gilette MU, Dubocovich ML. Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *FASEB J* 2004; 18: 1646-1656
103. Ashok BT, Ali R. The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp Gerontol* 1999; 34(3): 293-303
104. Barja G, Herrero A. Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J Bioenerg Biomembr.* 1998; 30(3): 235-43.
105. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552: 335-344
106. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 2003; 278(38): 36027-31

107. Trumpower BL. Cytochrome bc₁ complexes of microorganisms. *Microbiol Rev* 1990; 54(2): 101-29
108. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59(3): 527-605
109. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 2002; 82: 47-95
110. Fernandez-Checa J.C. Redoxregulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 304: 471-479
111. Gupta YK, Gupta M, Kohli K. Neuroprotective role of melatonin in oxidative stress vulnerable brain. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 2003; 47: 373-386
112. Kojo S. Vitamin C: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 2004; 11: 1041-1064
113. James AM, Smith RA, Murphy MP. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial coenzyme Q. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2004; 423: 47-56.
114. Ochi T, Miyaura S. Cytotoxicity of an organic hydroperoxide and cellular antioxidant defense system against hydroperoxides in cultured mammalian cells. *Toxicology* 1989; 55(1-2): 69-82
115. Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn TF. Direct inhibition of the mitochondrial transition pore: a possible mechanism responsible for the anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J.* 2004; 18: 869-871
116. Jou MJ, Peng TI, Reiter RJ, Jou SB, Wu HY, Wen ST. Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *J Pineal Res.* 2004; 37(1): 55-70
117. Jou MJ, Jou SB, Chen HM, Lin CH, Peng TI. Critical role of mitochondrial reactive oxygen species formation in visible laser irradiation-induced apoptosis in rat brain astrocytes (RBA-1). *J Biomed Sci.* 2002; 9(6 Pt 1): 507-16
118. Yerer MB, Yapislar H, Aydogan S, Yalcin O, Baskurt O. Lipid peroxidation and deformability of red blood cells in experimental sepsis in rats: The protective effects of melatonin. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004; 30(2): 77-82
119. Aydogan S, Yerer MB, Yapislar H. In vitro effects of melatonin on the filtrability of erythrocytes in SNP-induced oxidative stress. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004; 30(3-4): 317-22.
120. Fosslien E. Mitochondrial medicine--molecular pathology of defective oxidative phosphorylation. *Ann Clin Lab Sci.* 2001; 31(1): 25-67

121. Okatani Y, Wakatsuki A, Kaneda C. Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. *J Pineal Res.* 2000; 28(2): 89-96
122. Polat A, Emre MH. Effects of melatonin or acetylsalicylic acid on gastric oxidative stress after bile duct ligation in rats. *J Gastroenterol.* 2006 May;41(5):433-9.
123. Noyan T, Komuroglu U, Bayram I, Sekeroglu MR. Comparison of the effects of melatonin and pentoxifylline on carbon tetrachloride-induced liver toxicity in mice. *Cell Biol Toxicol.* 2006 May 15; [Epub ahead of print]
124. Eybl V, Kotyzova D, Koutensky J. Comparative study of natural antioxidants - curcumin, resveratrol and melatonin - in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicology.* 2006 Aug 15; 225(2-3):150-6.
125. Akcay YD, Yalcin A, Sozmen EY. The effect of melatonin on lipid peroxidation and nitrite/nitrate levels, and on superoxide dismutase and catalase activities in kainic acid-induced injury. *Cell Mol Biol Lett.* 2005;10(2):321-9.
126. Yerer MB, Aydogan S, Saraymen R. Alterations in the erythrocyte antioxidant enzyme levels in experimental sepsis: Role of Melatonin [Deneysel sepsiste eritrosit antioksidan enzim seviyelerindeki değişiklikler: Melatoninin rolü] *Türk Biyokimya Dergisi* 31 (3); 124-128: 2006

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Kayseri’de doğdu. İlk öğrenimini Şükrü Malaz ilkokulunda, orta öğrenimini Sami Yangın Anadolu Ticaret Lisesi’nde ve lise öğrenimini TED Kayseri Koleji’nde tamamladı. 1995 yılında kazandığı Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden 1999 yılında mezun oldu. Aynı yıl içinde Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans öğrenimine başlayarak, Sağlık Bilimleri Enstitüsü’ne Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2006 yılında Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’ne Araştırma Görevlisi olarak atandı. Gerek yurtiçi gerekse yurtdışı birçok kongrede sunduğu bildiriler ve bilimsel yayınlar ile halen aynı bölümde görevine devam etmektedir.