

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

**MELATONİNİN LİPOLİSAKKARİT İLE İNDÜKLENMİŞ DENEYSEL
SEPSİS MODELİNDE SIÇAN KARDİYAK FONKSİYONU ÜZERİNE
ETKİSİ**

Ecz. Berna KÖSEKAYA

**Tıbbi Farmakoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2020**

ÖZET

Köseaya, B., Melatoninin Lipopolisakkarit İle İndüklenmiş Deneysel Sepsis Modelinde Sıçan Kardiyak Fonksiyonu Üzerine Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2020. Bu çalışmada antioksidan etkileri ile öne çıkan ve pleiotropik bir endojen olan melatoninin sepsiste gelişen kardiyak disfonksiyona ve bir takım sepsis biyobelirteçlerine olan etkisi ve antioksidan kapasiteye katkısı incelenmiştir. Kalp fonksiyonunu değerlendirmek için Langendorff izole kalp perfüzyonu ve izole organ banyosu deney düzenekleri; biyokimyasal analizler için ELISA yöntemi kullanılmıştır. Langendorff deney düzeneğinde septik koşulların; kalbin kasılma ve gevşeme kapasitesini gösteren sol ventrikül basınç zaman eğrisinin zamana göre türevinin maksimum değerini azalttığı minimum değerini ise mutlak değerde azalttığı gösterilmiştir. Sol ventrikülün geliştirdiği basınç ve koroner akım hızı septik hayvanlarda anlamlı derecede düşmüştür. Septik hayvanlara melatonin uygulandığında bu negatif etkilerde düzelleme görülmemiştir. Ancak aynı parametrelerin bazale göre değişimlerin gösterildiği grafiklerde, melatonin uygulanmış septik hayvanlarda, septik hayvanlara göre anlamlı derecede daha az oranda değişim ölçülmüştür. LPS verilmiş hayvanların kalplerinden izole edilen atriyumun isoproterenole verdiği yanıt sağlıklı dokuya göre anlamlı derecede artmıştır. İzole organ banyosundaki diğer parametrelerde anlamlı fark görülmedi. ELISA ile kalp, dalak, karaciğer ve serumdaki belirteçler tespit edildi. Septisteki majör biyobelirteçler olan IL-1- β , IL-6 ve TNF- α seviyelerinde, melatonin verilmiş septik hayvan doku örneklerinde septik hayvanlara göre anlamlı derecede düşüş kaydedildi. Kardiyak disfonksiyon ile ilişkilendirilen ve sepsiste de artış gösteren IL-17 seviyesinin melatonin uygulanmış septik hayvanlarda azaldı. Melatonin sepsis ile azalan antioksidan kapasiteyi artırdı ve artan oksidan yükü azalttı.

Anahtar kelimeler: LPS, septik şok, kardiyak disfonksiyon, melatonin, pleiotropik etki. Bu çalışmanın bir kısmı THD-2017-15587 proje kodu ile Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklendi.

ABSTRACT

Kösekeya, B. Effect of Melatonin on Cardiac Function in an Experimental Model of Sepsis Induced by Lipopolysaccharide in Rats, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Philosophy of Doctorate (PhD) Thesis in Medical Pharmacology, Ankara, 2020. This present study investigated the effect of melatonin, a pleiotropic endogenous antioxidant agent, on sepsis induced cardiac dysfunction. Therefore, its effect on biochemical biomarkers at the molecular level and its contribution to antioxidant capacity were evaluated with ELISA. Langendorff isolated heart perfusion and isolated organ bath experimental setups were used to evaluate heart function. At septic rats the contraction/relaxation capacity of the heart has been reduced. Coronary flow rate and the pressure developed by the left ventricle decreased significantly in septic animals. There was no improvement in these targeted parameters at the melatonin treated septic group. On the other hand, the results shows the changes according to the baseline of these parameters, change rate in the melatonin treated septic animals was significantly less than that of the septic animals. The response of septic atrium to isoproterenol was significantly increased compared to that of healthy tissue. This increased contraction response was found to be decreased at melatonin treated septic animals after 10^{-8} M isoproterenol presence at the organ bath. No significant difference was observed in other parameters in the isolated organ bath experiments. IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels, major biomarkers of sepsis, in heart, spleen, liver and serum were decreased significantly in melatonin treated septic group compared to septic group. IL-17 has been associated with cardiac dysfunction in previous studies and this study showed that its levels was increased significantly in the presence of LPS. For the first time in the literature this study has shown that melatonin blocked the increase of IL-17 levels induced by sepsis. In line with previous studies melatonin treatment increased antioxidant capacity and decreased oxidant load in all samples.

Keywords: LPS, septic shock, cardiac dysfunction, melatonin, pleiotropic effect.

Major portions of this study were funded by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (THD-2017-15587).

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sepsis	3
2.1.1. Sepsisin Tarihi	3
2.1.2. Sepsis Tanımları	3
2.1.3. Sepsis ve Miyokart	4
2.1.4. Sepsiste Miyokart Fonksiyon Bozukluğunun Patofizyolojisi	5
2.2. Melatonin	6
2.2.1. Melatoninin Tarihçesi	6
2.2.2. Melatonin Hakkında Genel Bilgiler	6
2.2.3. Melatoninin Kimyasal Yapısı	7
2.2.4. Melatonin Sentezi ve Metabolizması	8
2.2.5. Endojen Senkronizör Olarak Melatoninin Biyoritmi	9
2.2.6. Melatonin Reseptörleri	11
2.2.7. Melatoninin Pleiotropik Etkileri	12
2.2.8. Kardiyovasküler Fonksiyonların Regülasyonu	13
2.2.9. Siklooksijenaz 2 (COX-2) İnhibisyonu ve Downregülasyonu	15
2.2.10. Bağışıklık Sisteminin Düzenlenmesi	15

2.2.11. Melatonin ve Serbest Radikaller	19
2.2.12. Antioksidan Enzimlerin Düzenlenmesi	20
2.3. Hipotez	21
2.4. Amaç	21
3. YÖNTEMLER	23
3.1. Deney Hayvanları	23
3.2. Etik Kurul İzni	23
3.3. Çözelti ve İlaçlar	23
3.4. Gruplar	24
3.5. Protokol	24
3.5.1. <i>In vitro</i> Organ Banyosu Düzenğinde İzole Bütün Atriyum ve Papiller Kas Fonksiyonunun İncelenmesi	26
3.5.2. Sabit Basınç Langendorff İzole Kalp Perfüzyonu Deney Düzenegi	27
3.5.3. ELISA: Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması	29
3.5.4. ELISA: Biyokimyasal Analizler	30
3.5.5. ELISA: Oksidatif Stres İndeksi	30
3.5.6. ELISA: TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-17 Düzeylerinin Ölçümü İçin Test Prensi	30
3.6. Verilerin Değerlendirilmesi	31
4. BULGULAR	32
4.1. Langendorff Düzenğinde Çalışan Kalpte Yapılan Ölçümler	32
4.1.1. LPS ve Melatoninin Sol Ventrikülün Geliştirdiği Basınç (LVDP) Üzerine Etkileri	34
4.1.2. LPS ve Melatoninin Kalp Atım Hızı Üzerine Etkileri	35
4.1.3. LPS ve Melatoninin Koroner Akım Hızı Üzerine Etkileri	36
4.1.4. LPS ve Melatoninin Maksimum Türev Değeri Değişimi Üzerinde Etkileri (dP/dt_{max})	37
4.1.5. LPS ve Melatoninin 30. dk'da Maksimum Türev Değeri Üzerinde Etkileri (dP/dt_{max})	38
4.1.6. LPS ve Melatoninin Minimum Türev Değeri Değişimi Üzerinde Etkileri (dP/dt_{min})	39
4.1.7. LPS ve Melatoninin 30. dk'da Minimum Türev Değeri Üzerinde Etkileri (dP/dt_{min})	40
4.2. İzole Organ Banyosu Deneyleri	41

4.3. ELISA Deneyleri ile Kalp, Dalak, Karaciğer Dokularında ve Serumda IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17, Düzeylerinin Ölçümleri ve TAS, TOS, SOD Değerleri	43
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	55
7. KAYNAKLAR	56
8. EKLER	
EK 1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	
EK 2. Dijital Makbuz	
EK 3. Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

ANOVA	<i>“Analysis of variances”</i>
AA-NAT	Arilalkilamin N-asetiltransferaz
AMK	N1-asetil-5-metoksiminaminamin
AFMK	N1-asetil-N2-formil-5-metokskininuramin
BKCa	Kalsiyum ile aktive olan K ⁺ kanalı
ATP	Adenozin Trifosfat
AV	Atriyoventriküler
Ca⁺⁺	Kalsiyum İyonu
CaCl₂	Kalsiyum Klorür
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CREB	<i>“Cyclic AMP-Response Element Binding Protein”</i>
CD	<i>“Cluster of Differentiation”</i>
CLP	<i>“Cecal Ligation and Puncture”</i>
COX-2	Siklooksijenaz 2
CO₂	Karbondioksit Gazı
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dP/dt_{max}	Basıncın Zamana Göre Türevinin En Yüksek Değeri
dP/dt_{min}	Basıncın Zamana Göre Türevinin En Düşük Değeri
EAS	Elektriksel Alan Stimülasyonu
GSA	Global Sepsis Alliance
GPx	Glutasyon peroksidaz
GABA	Gama-Aminobütirik Asit
GPCR	G-proteini ile kenetli reseptörler
GSH	Glutasyon
HMGB1	<i>“High Motility Group Protein B1”</i>
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
IML	İntermediolateral çekirdek
i.p.	İntraperitoneal

KCl	Potasyum Klorür
KHS	Krebs-Henseleit Solüsyonu
KH₂PO₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat
LPO	Lipid Peroksidasyonunu
LPS	Lipopolisakkarit
LVDP	<i>“Left Ventricular Developed Pressure”</i>
LVEF	<i>“Left Ventricular Ejection Fraction”</i>
mt-RNr2	<i>16S ribozomal RNA</i>
mt-Co1	<i>Sitokrom C oksidaz I</i>
mt-Co3	<i>Sitokrom C oksidaz II</i>
mt-Nd1	<i>NADH dehidrogenaz 1</i>
mt- ATP6	<i>ATP sentaz alt ünitesi 6</i>
MgSO₄	Magnezyum Sülfat
Na⁺	Sodyum İyonu
NA	Noradrenalin
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	Nöronal NOS
NaCl	Sodyum Klorür
NaHCO₃	Sodyum Bikarbonat
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
OAB	Ortalama Arteriyel Basınç
O₂	Oksijen Gazı
ONOO⁻	Peroksinitrit
OSI	Oksidatif Stres İndeksi
GSSG	Okside Glutatyon
PAH	Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon
PVN	Paraventriküler Çekirdek

PG	Prostaglandinlerin
PAMP	<i>“Pathogen Associated Molecular Pattern”</i>
PaO₂	Parsiyel Oksijen Basıncı
pD₂	Maksimum Etkinin %50’sini Oluşturan Konsantrasyonunun Negatif Logaritması Agonist
PEEP	<i>“Positive End Expiratory Pressure”</i>
pps	<i>“Pulse per Second”</i>
qSOFA	<i>“Quick Sequential Organ Failure Assessment”</i>
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
SA	Sinoatriyal
SERCA	<i>“Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase”</i>
SCN	Suprakiazmatik Çekirdek
SIRS	<i>“Systemic Inflammatory Response Syndrome”</i>
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAS	Total Antioksidan Kapasite
TOS	Total Oksidan Kapasite
TLR	<i>“Toll Like Receptors”</i>
TNF-α	<i>“Tumor Necrosis Factor α”</i>

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Melatoninin kimyasal yapısı	7
2.2. Melatonin biyosentezi	8
2.3. Retinohipotalamik yolak	11
2.4. Melatoninin pleiotropik etkileri	13
2.5. Melatonin ve immün sistem	18
3.1. Deney protokolü zaman çizelgesi	25
3.2. Langendorff deney düzeneği	29
4.1. Langendorff deney düzeneğinde ölçülen LVDP (A) , kalp atım hızı (B) , koroner akım hızı (C), dP/dt_{max} (D), dP/dt_{min} (E) parametrelerine ait bazal değerlerinin karşılaştırılması	32
4.1.1. LVDP'nin bazale göre değişimi	33
4.1.2. Kalp atım hızının bazale göre değişimi	34
4.1.3. Koroner perfüzyon hızının bazale göre değişimi	35
4.1.4. $+dP/dt_{max}$ değerlerinin bazale göre değişimi	36
4.1.5. $+dP/dt_{max}$ 30. dk değerleri	37
4.1.6. $+dP/dt_{min}$ değerlerinin bazale göre değişimi	38
4.1.7. $+dP/dt_{min}$ 30. dk değerleri	39
4.2.1. İzole organ banyosunda atriyumun isoproterenol (A,B) ve karbakol (C) izometrik gerim değişikliği yanıtları	40
4.2.2. İzole organ banyosunda papiller kasın isoproterenol (A) ve karbakol (B) izometrik gerim değişikliği yanıtları	41
4.3.1. Sıçan dalak, kalp, karaciğer ve serum örneklerinde IL-1 β düzeyleri	42
4.3.2. Sıçan dalak, kalp, karaciğer ve serum örneklerinde IL-6 düzeyleri	43
4.3.3. Sıçan dalak, kalp, karaciğer ve serum örneklerinde IL-17 düzeyleri	44

4.3.4. Sıçan dalak, kalp, karaciğer ve serum örneklerinde TNF- α düzeyleri	45
4.3.5. Sıçan dalak, kalp, karaciğer ve serum örneklerinde TAS düzeyleri	46
4.3.6. Sıçan dalak, kalp, karaciğer ve serum örneklerinde TOS düzeyleri	47
4.3.7. Sıçan dalak, kalp, karaciğer ve serum örneklerinde OSI düzeyleri	48

TABLolar

Tablo	Sayfa
3.1. Deney grupları	24
4.1. Langendorff düzenğinde kalbin fonksiyonel ölçümlerinin bazal değerleri	32

1. GİRİŞ

Melatonin pleiotropik etkili bir moleküldür ve literatürde antioksidan, antiinflamatuvar, antitrombotik etkileri üzerine oldukça fazla çalışma bulunmaktadır. Antiinflamatuvar etkisi inflamasyon indüklenmiş çeşitli dokularda C-reaktif protein, myeloperoksidaz, TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-8 seviyelerini azaltması ile gösterilmiştir. Melatoninin antioksidan etkisi uzun yıllardan beri bilinmektedir. Melatoninin süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, peroksinitritler ve iNOS enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Birçok çalışmada glutatyon (GSH) üretimini stimüle edip bununla birlikte glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GSSG-R), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT), gibi antioksidan enzimlerin DNA ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir. Melatonin nNOS, i-NOS ve i-mtNOS' u inhibe edip aynı zamanda mitokondriyal fonksiyonu ve hücrenin enerji üretimini desteklediğine yönelik güncel çalışmalar bulunmaktadır.

Kardiyak disfonksiyonun önemli sebeplerinden olan serbest radikaller, platelet agregasyonu, mitokondriyel disfonksiyon gibi faktörlerin melatoninin pleiotropik etkileri ile inhibe edildiği moleküler çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada moleküler düzeydeki olumlu etkilerin fonksiyonel düzeye yansması beklenmektedir. Sepsis ile bozulan kardiyak fonksiyonun melatonin uygulandığında düzeliş düzelmeyeceği incelenecektir. Bu amaçla bu çalışmada atriyum ve papiller kasın ayrı ayrı fonksiyonlarının değerlendirildiği izole organ banyosu deneyleri ve ayrıca kalbin fonksiyonunu bir bütün olarak değerlendirebilen Langendorff deneyleri tasarlanmıştır.

Sepsis ile indüklenen IL-1 β , IL-17, IL-6, TNF- α gibi proinflamatuvar ve IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokin düzeylerinde melatoninin antiinflamatuvar etkileri göz önüne alınarak azalma gözlenmesi öngörülmektedir. Ayrıca antioksidan etkisini belirleyen total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan kapasite (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) değerlerinde de septik sıçanlara göre melatonin uygulanan hayvanlarda düzeliş beklenmektedir. Bu sebeple hayvanlardan alınan kalp, dalak, karaciğer ve serum örnekleri bu biyobelirteçler açısından biyokimyasal deney düzeneği ELISA ile değerlendirilecektir.

Mevcut bilgiler ışığında hipotez; "*Melatonin sepsiste gözlenen myokart fonksiyon bozukluğu üzerine düzeltici etki gösterir.*" olarak belirlenmiştir. Amaç ise; sıçan sepsis modelinde melatoninin kardiyak doku ve fonksiyondaki bozulmalar üzerine etkilerini *in vitro* deney düzeneklerinde değerlendirmektir. Bu çalışma; henüz kesin tedavisi olmayan ve mortalitesi yüksek olan sepsiste destekleyici tedavi olarak verilecek maddenin olası düzeltici fonksiyonlarının gösterilmesi ile birlikte; gelecekte bu maddenin sepsis tedavisinde kullanılabilecek alternatif bir ilaç olmasına veya benzer mekanizmalar ile etki gösteren ilaç adaylarının ortaya çıkmasına sebep olabilir. Bu durum sepsiste mortalitenin azaltılmasına yardımcı olabilmesi açısından uluslararası sağlık alanında önemli bir gelişme olarak yerini alabilecektir. Ayrıca bilindiği kadarıyla melatonin septik kardiyak fonksiyona etkisi hem Langendorff hem de izole organ banyosu deney düzenekleri ile birlikte değerlendirildiği ilk çalışma olacaktır. Literatürde bilindiği kadarıyla melatoninin sağlıklı ve septik hayvanda IL-17 seviyeleri üzerindeki olası etkileri ile ilgili bir veri bulunmamaktadır. Bu konuda da literatüre katkı sağlayacaktır. Bütün bu bilimsel açılardan bu çalışma, daha önceden literatürde olmayan bir boşluğu doldurmak ve yeni sorular ortaya çıkarmak üzere tasarlanmıştır. Bu yüzden çalışmada elde edilecek veriler, yeni araştırma fikirlerinin ortaya çıkmasına ve diğer araştırmacıların da farklı çalışmalar ortaya koyabilmesine olanak sağlayacaktır. Bu araştırma, sonunda elde edilecek olan özgün veriler ile etki faktörü yüksek dergilerde yayın ve bildiri yapabileme ve sonucunda alacağı atıf sayısı ile üniversitemiz adına bilimsel katkıda bulunma olanağı sağlayabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sepsis

2.1.1. Sepsisin Tarihi

Sepsis kelimesi “shjiz” kökünden türetilmiştir ve yunanca “Bir hayvanın veya sebzenin veya organik maddenin bakteri varlığında ayrışması.” anlamına gelir (1). Bir hekim ve aynı zamanda düşünür olan Hipokrat (Hippocrates) Corpus Hippocraticum'daki yazılarında sepsise değinmiştir. Hipokrat; sepsisi tehlikeli, kokulu, biyolojik çürüme olarak görmüş ve düzensiz bir vücut hümörü kavramının “kanın vücut sıvıları, sarı safra, kara safra ve balgam gibi” hastalık nedeni olarak ortaya çıkması olarak tanımlamıştır. Eczacılığın temellerini oluşturan Galen daha sonra, sepsisin yara iyileşmesi için gerekli olan övgüye değer bir olay olduğunu yazmıştır (2). Modern tıpta ilk sepsis tanımlamaları 1991'deki konsensüs konferansında yapılmış (3) ve 2001 de güncellenerek klinik deneyimlerden elde edilen verilerle sepsis belirti ve semptomlarının listesi genişletilmiştir (4).

2.1.2. Sepsis Tanımları

İlk sepsis tanımları arasında sepsis, şiddetli sepsis ve septik şok vardır. Yoğun Bakım Derneği ve ayrıca Avrupa Yoğun Bakım Derneği, uluslararası fikir liderleri Delphi Konsensüsü süreci esnasında sepsis ve septik şok tanımlarını (Sepsis-3) revize etmiştir. Konsensüs bu yeni tanımlamalarda infeksiyon ve inflamasyon arasındaki ilişkiden uzaklaşıp sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) kriterlerini tamamen bırakmıştır. Sepsis; infeksiyona karşı disregüle konakçı tepkisinin neden olduğu yaşamı tehdit eden bir organ disfonksiyonu olarak tanımlanırken; septik şok, yeterli sıvı resüsitasyonuna rağmen serum laktat derişimi $> 2\text{mmol} / \text{L}$ ($18\text{ mg} / \text{dL}$) olan ve ortalama arteriyel basıncı 65 mmHg ve üzerinde tutulabilmesi için vazopressör gerekliliğinin olması gibi klinik kriterleri ile tanımlanmıştır (5).

Sepsis insidansını azaltmaya yönelik kurulan bir yardım kuruluşu olan Global Sepsis Alliance (GSA)'a göre sepsis her yıl 27 ila 30 milyon insanı etkilemekte ve 7 ila 9 milyon kişi septik şoktan ölmektedir. Hayatta kalabilen birçok hasta ise yaşamlarının

geri kalanında sepsisin bıraktığı zorluklarla mücadele etmektedir (6). Bu verilere göre, sepsis çeşitli kanser türleri ve AIDS gibi toplum bilinirliği yüksek olan hastalıklar kadar ciddi ve ölümcül bir sağlık sorunu olduğu halde, Amerika ve Avrupa'da yapılan bir anket çalışmasına göre; halkın neredeyse % 90'ı sepsis terimini hiç duymamış, sepsis terimini duyan kişilerden ise % 60'ından azı önde gelen bir ölüm nedeni olduğunu anlamıştır (7). Sepsis, tıp dışı çevrelerde tanınırlığı az olsa da önde gelen hastane ölümlerinden biridir ve uygun şekilde kontrolü ile birçok hayat kurtarılabilir.

2.1.3. Sepsis ve Miyokart

Sepsis belirli bir hastalık değil, belirsiz bir patobiyolojiyi içeren bir sendrom olduğu için henüz hem tanısında hem de tedavisinde altın standart bulunmamaktadır. Septik şok ile ilgili ölümlerin yaklaşık % 15'i miyokart depresyonu nedeniyle (8). Miyokart depresyonu, vücudun metabolik taleplerini karşılamayan kalp debisi olarak tanımlanır (8, 9). Sepsis sırasındaki miyokart depresyonu açıkça tanımlanmasa da kalbin sol ve sağ bölmelerinin global (sistolik ve diyastolik) disfonksiyonu olduğu söylenebilir. Sepsisteki miyokart depresyonunun patogenezi, sistemik (hemodinamik) faktörlerin etkileri ve genetik, moleküler, metabolik değişikliklerin bileşimini içermektedir (10). Sepsisteki kardiyak fonksiyon bozukluğu ventriküler dilatasyon, ejeksiyon fraksiyonunda azalma ve azalmış kasılma ile karakterizedir. Başlangıçta, kalp yetersizliği sadece "hipodinamik" şok aşamasında meydana geldiği düşünülürken, şimdi erken dönemde de (septik şokun "hiperdinamik" evresi meydana geldiği bilinmektedir (11).

Septik hastaların kan dolaşımında normal değerlere göre daha yüksek seviyelerde interlökinler ve kompleman bileşenleri bulunur (12). Sıçan sepsis modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, *in vitro* TNF- α , IL-1 β (13) ve IL-6'ya (14) maruz kalan kardiyomyositlerde kasılma ölçümlerinde önemli düşüşler göstermektedir. Ağır sepsis / septik şokta miyokart depresyonu baskın ölüm nedeni olmasına rağmen, fonksiyonel değişikliklerin yapısal değişikliklerin bir sonucu olup olmadığı konusu tartışmalıdır (15).

Doku hipoperfüzyonu ile hemodinamik değişikliklerin gelişimi, ağır sepsisi karakterize eden çoklu organ disfonksiyonu ile sonuçlanır. Septik şok, sıvı resüsitasyonuna direnç gösteren hipotansiyon olarak tanımlanır. Kalp, ağır sepsis / septik şokta önemli bir hedef organdır. 2005 yılındaki bir derlemede düşük kardiyak indeks veya kardiyak disfonksiyonun ekokardiyografik kanıt dâhil olmak üzere sepsiste miyokart depresyonunun önemine dikkat çekmiştir (16). Yoğun bakım ünitelerine başvuran hastaların yaklaşık % 60'ında, şiddetli sepsiste ciddi bir belirti olarak kabul edilen kardiyak disfonksiyon görülmüştür. Yoğun bakımdaki septik hastalarda mortalite oranına bakıldığında ise yalnızca yaklaşık % 20'sinde kardiyak katılım görülmemiştir (17, 18).

2.1.4. Sepsiste Miyokart Fonksiyon Bozukluğunun Patofizyolojisi

Celes ve ark. (15) sepsiste miyokart fonksiyon bozukluğunun patofizyolojisinin altında yatan temel mekanizmaları derlemişlerdir. Bunlar aşağıdaki gibi listelenmiştir:

- (a) Mikrovasküler disfonksiyon ve bozulmuş miyokardiyal oksijen ekstraksiyonu,
- (b) β -adrenerjik reseptörlerin otonomik disregülasyonu ve postreseptör sinyalizasyon yolağı depresyonu,
- (c) β_1 adrenerjik reseptörler ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) etki aracılı metabolik bozukluklar,
- (d) Sitokrom c salıverilmesinin artmasıyla mitokondriyal dış membran destabilizasyonunun bir sonucu olarak mitokondriyal işlev bozukluğu,
- (e) TNF - α , IL -1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesinin artması,
- (f) Erken septik miyokart depresyonunda yapısal, endotel ve nöronal nitrik oksit sentaz'ın ve geç sepsiste iNOS'un aktivasyonuna bağlı nitrik oksit (NO) kaynaklı depresyon,
- (g) Uzun süreli miyokart depresyonunun modülatörü olan NO'nun aşırı üretiminin bir yan ürünü olan peroksinitrit,
- (h) Ekstrinsik, intrinsik yolların aktivasyonu ile apoptotik miyokart hücre ölümü,
- (i) Sepsisin hiperdinamik evresinde miyositlerde L tipi kalsiyum kanalı baskılanması nedeniyle azalmış sitozolik kalsiyum seviyeleri,

- (j) Hipodinamik septik şok sırasında, ryanodin reseptörü tip 2 yoğunluğunun azalması ile sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum salıverilmesinin azalması.

2.2. Melatonin

2.2.1. Melatoninin Tarihçesi

Bilinen yazılı tarihte en eski zamanlardan beri epifiz bezinin önemli bir yeri olmuştur. 17. yy'da Fransız filozof René Descartes pineal bez için insan ruhunun oturduğu koltuk demiştir ve ruhun akışını kontrol ettiğini ileri sürmüştür (19), McCord ve Allan 1917'de pineal bez ekstratının kurbağa derisi üzerinde ağartıcı etkisi olduğunu keşfetmişlerdir (20, 21). Lerner ve ark. ise pineal ekstratta bulunan bu renk açıcı etkili maddenin dermatolojik rahatsızlıklarda tedavi edici etkili olabileceğini düşünerek pineal ekstrattan biyoaktif bileşiği izole etmeyi başarmış ve bu bileşiğin kimyasal yapısını N-asetil-5-metoksitriptamin yani melatonin olarak tanımlamışlardır (22). Böylelikle melatoninin modern tıptaki araştırmaları başlamıştır.

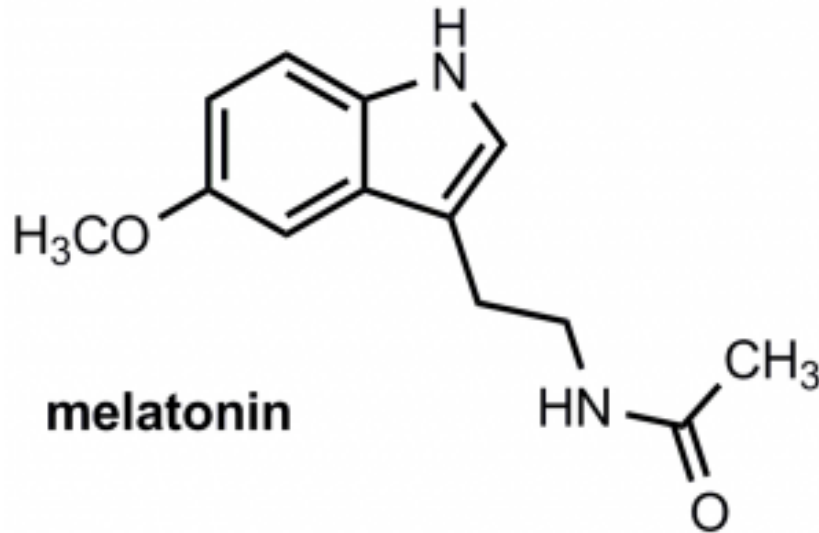
2.2.2. Melatonin Hakkında Genel Bilgiler

Melatonin, bakteriler ve diğer tek hücreli mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar gibi canlı türlerinde ve insanlarda bulunan doğal bir maddedir (23, 24). Epifiz bezinden sirkadiyen olarak salıverilen melatonin çeşitli fizyolojik süreçler ve davranış üzerinde etkili pleiotropik bir moleküldür. Melatoninin kana salıverilmesi karanlıkta arttığı için "karanlığın hormonu" veya "uyku hormonu" olarak da bilinmektedir (25, 26). Ana üretim yeri epifiz olsa da melatonin retina, deri ve lenfositler, gastrointestinal kanal gibi diğer organlarda da sentezlenmektedir (27-30). Melatonin biyosentezinin yapıldığı ekstrapineal bölgeler arasında gastrointestinal kanal, epifiz bezine göre yüzlerce kat fazla melatonin içerdiği için önemlidir. Gastrointestinal kanaldaki melatonin, özellikle yüksek triptofan diyetinin etkisi ile dolaşıma geçtiği bilinmektedir (31). Buna rağmen, memelilerde dolaşımdaki melatoninin epifiz kaynaklı olduğu (32), diğer organlarda sentezlenen melatoninin ise lokal etki gösterdiği ileri sürülmektedir (33). Bu nedenle hormon olarak etkinlik yönünden en önemli melatonin kaynağı epifizdir. Bağışıklık sisteminin işlevinin

güçlendirilmesi (34), vazoregülatör aktivite (35), kanser hücrelerinin büyümesinin inhibisyonu (36) ve sirkadiyen ritm, uyku bozukluklarının tedavisindeki kullanımı (37) melatoninin hormonsal etkilerine dayanmaktadır.

Melatoninin en temel işlevinin, organizmaları oksidatif strese karşı koruyan antioksidan etkisinin olduğu düşünülmektedir (38). 2002 yılındaki bir derlemede melatoninin güçlü antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkilerini kanıtlayan 800'den fazla doğrudan veya dolaylı çalışma olduğu bildirilmiştir (39). Melatoninin filogenetik olarak ilk işlevinin doğrudan veya dolaylı olarak antioksidan aktivitesi ile ilişkili olması mümkündür. Melatonin kalp hastalıkları da dâhil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak dikkat çekmektedir ve terapötik etkinliğinin kaynağı majör olarak antioksidan aktivitesi ile ilişkilendirilmektedir (40-42).

2.2.3. Melatoninin Kimyasal Yapısı

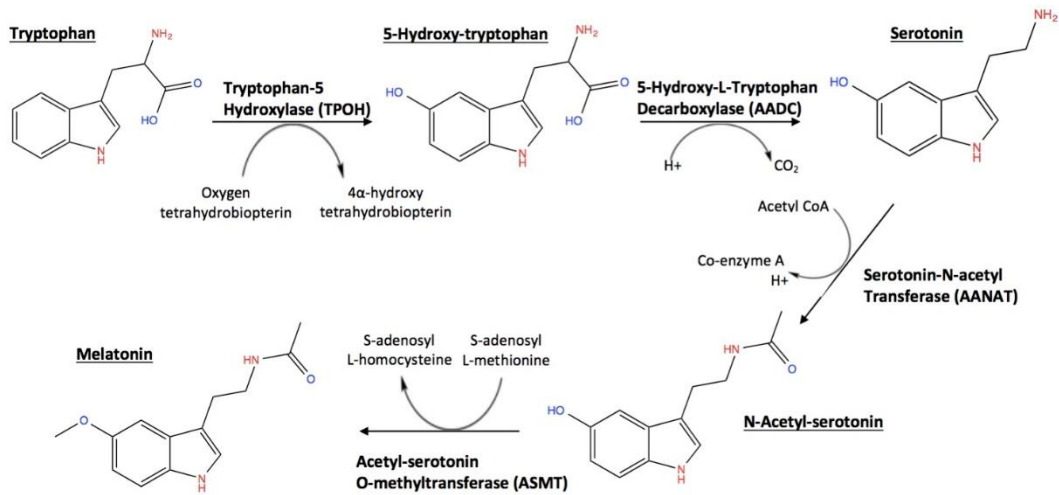


Şekil 2.1. Melatoninin kimyasal yapısı (138)

Melatonin; bir indol heterosiklik halka ve iki yan zincir, yani bir 5-metoksi grubu ve 3-amid grubu içerir. Melatoninin kimyasal yapısı, Şekil 2.1.'de gösterilmektedir. Serbest radikalleri temizlemek için gerekli olan çekirdek yapı yüksek rezonans kararlılığına sahip, elektronca zengin indol halkası olup melatoninin güçlü serbest radikal temizleme kapasitesini belirler (43). Melatoninin birincil fonksiyonu

serbest radikal süpürücü ve geniş spektrumlu antioksidan olarak hareket etmesidir. Bu indolaminin reseptör-aracılı fonksiyonlarının evrim sırasında edinilmiş olabileceği öne sürülmüştür (44).

2.2.4. Melatonin Sentezi ve Metabolizması



Şekil 2.2. Melatonin biyosentezi (139)

Melatonin biyosentezinin enzimatik işleyişi ilk olarak Axelrod ve ark. tarafından pinealositlerde tanımlanmıştır. Melatonin dört aşamalı bir enzimatik yol ile esansiyel bir aminoasit olan triptofandan sentezlenir. Triptofan ilk önce hidroksele edilir ve daha sonra dekarboksilasyona uğrar ve serotonin (5-hidroksitriptamin) oluşur. Serotonin, çoğu zaman hız kısıtlayıcı bir enzim olan arilalkilamin N-asetiltransferaz (AA-NAT) ile asetillenerek N-asetil-serotonin'e dönüştürülür. Son adımda N-asetil-serotonin, melatonin oluşturmak üzere hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) ile metillenir (23, 45). Melatonin biyosentezi şekil 2.2.'de gösterilmiştir. Epifiz bezi tarafından üretilen melatonin dolaşıma salınır ve çeşitli sıvılara, dokulara ve hücrel bölmelere erişir. Yüksek lipofilitesi olan melatonin epifiz bezinde depolanmadığından plazma seviyesinin profili pineal aktiviteyi yansıtır (46).

Melatonin metabolizması esas olarak karaciğerde olur, burada ilk önce hepatik sitokrom p450 tarafından C6 pozisyonunda (6-hidroksi-melatonin) hidroksele edilir, daha sonra sülfat ve daha az oranda glukronik asit ile konjüge edilir ve son

olarak idrarla atılır (46). İdrar 6-sülfatoksimeletonin (melatoninin başlıca metaboliti) ve serum melatonin konsantrasyonları birbirine paraleldir (47). Sentezinde olduğu gibi atılımında da sirkadiyen bir ritm vardır; karanlıkta daha yüksek oranlarda atılım olur (32). Melatoninin yarılanma ömrü, 2 dakikalık ilk ve 20 dakikalık ikinci dağılım yarılanma ömrü ile bieksponeyeldir (48). Melatonin, beyin omurilik sıvısına pineal girinti aracılığı ile saliverilir (49). Melatonin seviyesi 3. ventrikülün serebrospinal sıvısında kana göre 20-30 kat daha fazladır (50) ve epifiz bezinden uzaklaştıkça bu seviye artan mesafeyle hızla azalmaktadır (51). Melatonin üretimi, bireyler arası önemli farklılıklar göstermektedir (52). Bazı kişiler yaşamları boyunca diğerlerinden daha fazla melatonin üretirler, ancak bu varyasyonun önemi bilinmemektedir. İkizler üzerinde yapılan çalışmalar bu farklılıkların genetik bir tabana sahip olabileceğini düşündürmektedir (53).

Melatonin metabolizması hızlıdır ve insanlarda ekzojen uygulama sonrası yarılanma ömrü 10 ila 60 dakika arasında değişir. Melatonin aynı zamanda kinuramin türevlerine metabolize edilir (54). Melatoninin antioksidan özelliklerinin N1-asetil-5-metoksiminaminamin (AMK) ve N1-asetil-N2-formil-5-metokskininuramin (AFMK) gibi bazı metabolitleri tarafından olduğu bilinmektedir (55). Böylece melatonin kendisinden sonra da, metabolitleri ile de serbest radikal süpürücü etkisini çoğaltan bir antioksidan moleküller dizisine yol açar. Bu onu diğer antioksidanlardan ayıran en önemli özelliğidir.

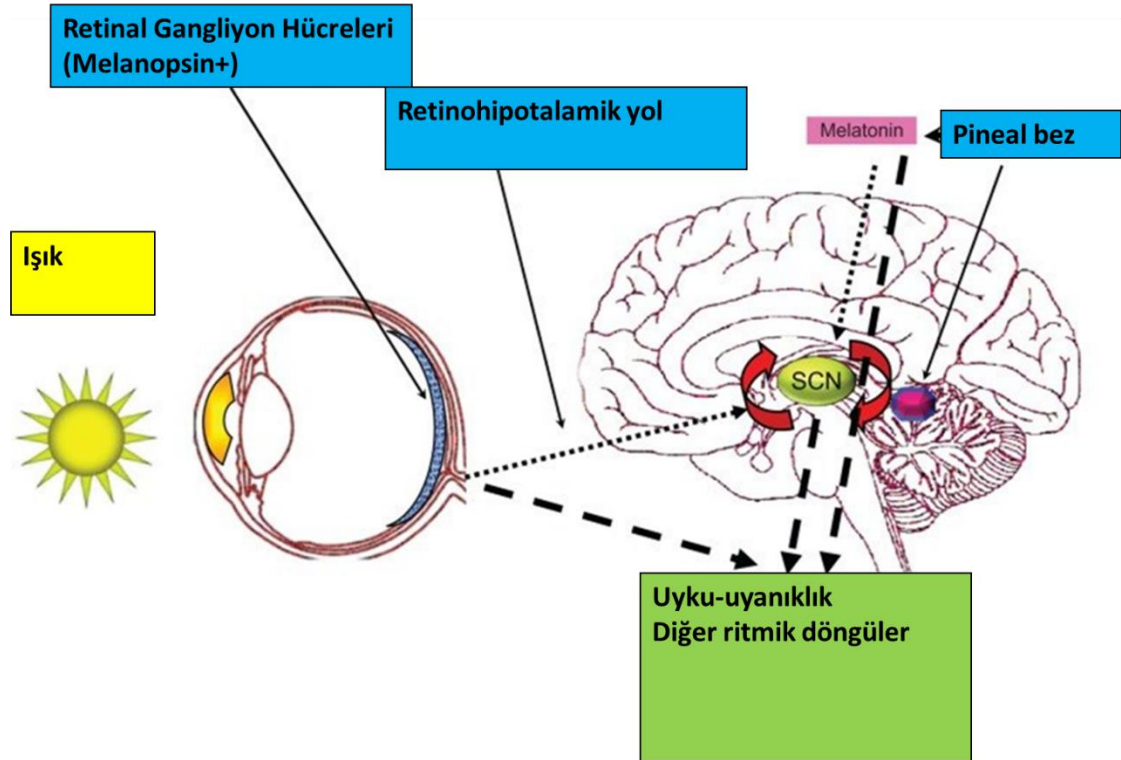
2.2.5. Endojen Senkronizör Olarak Melatonin Biyoritmi

Melatonin memelilerde günlük ve mevsimsel olarak davranış ve fizyoloji üzerindeki sirkadyen düzendeki etkileri nedeni ile hormon olarak değerlendirilmiştir (33, 56). Ancak melatoninin bazı özellikleri onu klasik hormonlardan ayırmaktadır. Bu özelliklere otakoid ve parakrinoid etkileri, depolama mekanizmasının eksikliği, sebze ve meyveler gibi alternatif kaynaklarda da olması ve reseptör-aracılı olmayan serbest radikal süpürücü etkisi örnek verilebilir (56).

Pineal melatonin üretimi gündüz düşük seviyede ve gece ise yüksek seviyede olacak şekilde sirkadiyen bir ritm sergiler. Bu sirkadiyen ritm, diüurnal veya noktüurnal

aktif olarak tüm canlı organizmalarda görülür (57). Pineal bez ile suprakiazmatik çekirdek (SCN) arasında doğrudan ilerleyen bir nöral multisinaptik bir yol (retinohipotalamik lifler) vardır (58). Retinohipotalamik lifler SCN'de sinaps yapar. SCN'den gelen sirkadiyen sinyaller sırayla paraventriküler çekirdeklere (PVN), omuriliğin intermediolateral çekirdeğine (IML), postgangliyonik sempatik liflerin bulunduğu superior servikal gangliyonik nöronların aksonları ile ise nihayet pineal beze ulaşır (59-61). Epifiz bezinde melatonin sentezinin biyolojik saati hipotalamik SCN'de düzenlenir. Karanlık/aydınlık döngüsü, retinanın gangliyon hücrelerinde yer alan melanopsin adlı ışığa duyarlı özel pigmentler tarafından fototransdüksiyon mekanizması (62, 63) ile majör sirkadyen osilatör SCN'ye ulaştırılır (61, 64). SCN kendisine ulaşan fotik bilgiye göre PVN üzerinde inhibitör ve eksitatör etki göstererek melatoninin günlük sentez ritmini düzenler; inhibitör etkiden gama aminobütrik asit (GABA) , eksitatör etkiden ise glutamat sorumludur (65, 66).

Postgangliyonik sinir uçlarına ulaşan eksitatör sinyal noradrenalin (NA) salıverilmesine neden olur. Bu adrenerjik uyarı ise melatonin sentezi için hız kısıtlayıcı enzim olan AA-NAT'ın transkripsiyonel artışını sağlar, böylece melatonin sentezi belirgin derecede artar (67-69). Dolaşımdaki melatoninin neredeyse tamamı pineal üretimden kaynaklanır (70) ve tüm dokulara çok kısa bir sürede ulaşır (71).



Şekil 2.3. Retinohipotalamik yolak (Vosko A. ve ark. (72)'dan uyarlanarak alınmıştır)

2.2.6. Melatonin Reseptörleri

Melatonin bazı etkilerini reseptörleri aracılığı ile gösterir (73, 74). *Xenopus laevis* melanoforlarında eksprese edilen ilk melatonin reseptörü geni, 1994 yılında klonlanmıştır (75). Bundan sonra birçok reseptör ve reseptör fragmanı farklı hayvan sınıflarından klonlanmıştır (76). Melatonin reseptör genlerinin klonlanması, bu reseptör ailesinin G-proteini ile kenetli reseptörlerin (GPCR'ler) süper-ailesine ait olduğunu ortaya çıkarmıştır. Melatonin reseptörleri GPCR'lerin başlıca yapısal özelliklerine sahiptir, yani bir hücre dışı N-terminali ve bir hücre içi C-terminali ile bağlanmış yedi transmembran alana sahip tek bir polipeptit zincirinden oluşur ve dahası GPCR-ailesine ait temel birkaç amino asit kalıntısı da barındırır (76). En iyi bilinen reseptörleri MT_1 ve MT_2 'dir ve son olarak MT_3 adı verilen üçüncü bir bağlanma noktası tanımlanmıştır (77). Birçok G protein bağlı reseptörler, MT_1 ve MT_2 reseptörleri de hücrelerde dimer olarak yer alırlar (78). Melatonin ile ilişkilendirilen bir başka reseptör olan GPR50 insanlar da dahil olmak üzere farklı türlerde de bulunmuştur. Bu reseptörün melatonini bağlamadığı fakat MT_1 reseptörüne

bağlanmayı değiştirerek melatonin fonksiyonunda bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Melatonin aynı zamanda kalsiyum bağlayıcı protein kalmodulin (79) veya tubulin gibi sitoplazmik proteinlere ve RZR / ROR gibi nükleer reseptörlere bağlanarak da etki eder (80). Deride MT₁ (81), yenidoğan keratinositlerinde MT₂ reseptörleri tespit edilmiştir (82).

Melatonin, hücre zarında yer alan reseptörlerine bağlanarak iyon kanalları ve ikinci habercileri üreten enzimler gibi GPCR'ler aracılığı ile hücrenin işlevini düzenler. Melatoninin, hücre içi siklik adenosin monofosfat (83) konsantrasyonunu azalttığı (84), siklik guanosin monofosfat (85), hücre içi Ca⁺⁺ konsantrasyonu (86), protein kinaz C (87), diasilgliserol ve araşidonik asit (88) gibi diğer ikinci habercileri de düzenlediği gösterilmiştir.

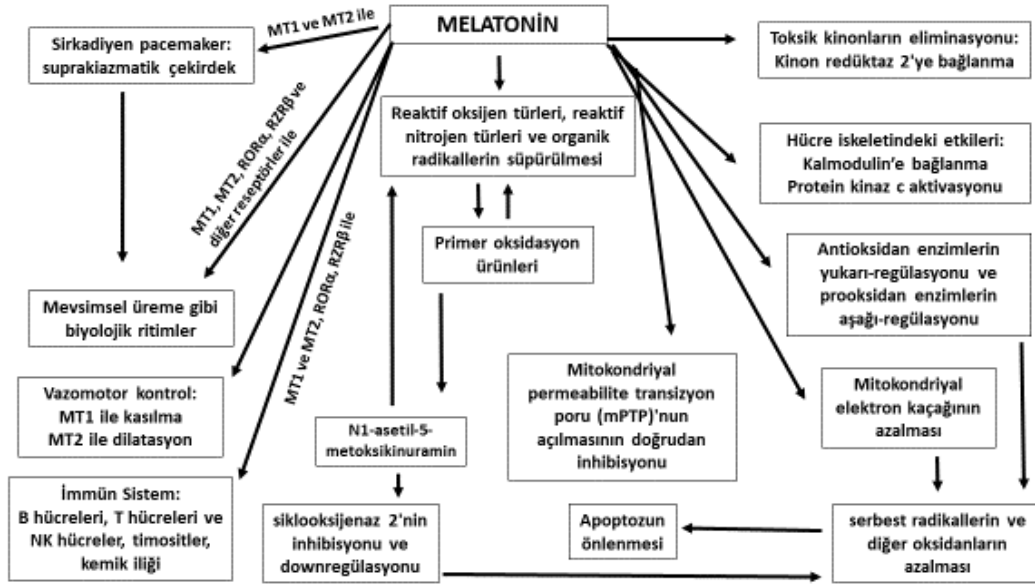
Bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmalar sonucu melatoninin biyolojik etkilerinin; nükleer reseptörleri, RZR/ROR'un ekspresyonunu ve fonksiyonunu, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini modüle ettiğini bulmuşlardır. Nükleer reseptörlere bağlanan melatonin, hücresel proliferasyonda rol oynayan 5-lipooksijenaz, p21 veya kemik sialoprotein gibi çeşitli genlerin transkripsiyonunu değiştirir (89). Antioksidan enzimlerin ekspresyonunu (90), SCN ve pars tuberalis hücrelerindeki gen ekspresyonunu düzenleyebilir (91).

Melatoninin bir başka etki mekanizması hücre içi kalsiyum ve kalmodulin aktivitesini modüle etmesi olabilir. Kalsiyum ile aktive edilmiş kalmodulin, hücre döngüsünün S ve M fazlarının başlatılmasında, hücre döngüsüyle ilgili gen ekspresyon regülasyonunda ve sessiz hücrelerin Go'dan hücre döngüsüne geri dönüşünde rol oynar (86).

2.2.7. Melatoninin Pleiotropik Etkileri

Melatonin uyku ve sirkadyen ritm regülasyonu, immün regülasyon mekanizmaları, serbest radikal süpürücü antioksidan fonksiyonlar, onkostatik eylemler, üreme fonksiyonlarının kontrolü, ruh halinin düzenlenmesi, immün sistemin düzenlenmesi gibi vücudun çeşitli fonksiyonlarında önemli rol oynar. Melatonin birçok mevsimsel, fizyolojik, immünolojik ve reseptör-aracılı veya

reseptörler üzerinden olmayan fonksiyonlara aracılık ettiği için pleiotropik bir moleküldür (25, 26).



Şekil 2.4. Melatoninin pleiotropik etkileri (Pandi-Perumal SR ve ark. (23)'den uyarlanarak alınmıştır)

2.2.8. Kardiyovasküler Fonksiyonların Regülasyonu

Sağlıklı ve koroner kalp hastalığı olan hastaların koroner arterlerinde MT_1 ve MT_2 reseptörlerinin eksprese edildiği gösterilmiştir (92, 93). Koroner hastalarda ve sağlıklı kişilerde MT_1 reseptörünün koroner arter ekspresyonu benzer bir ritm ve amplitüd izlerken; koroner rahatsızlığı olan hastaların sol ventrikül, aorta ve koroner arterlerdeki MT_2 ekspresyonu kontrole göre farklılık göstermiştir (92, 94). MT_1 reseptörü aktivasyonu vazokonstriksiyon ile ilişkili iken, melatonin MT_2 reseptörünün aktivasyonu yoluyla vazodilatasyon yaptığı hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (95, 96). Melatoninin vazokonstriktör etkisi yüksek kondüktanslı kalsiyumla aktive edilen K^+ kanalı (BK_{Ca}) inhibisyonu ile olur. MT_1 ve MT_2 reseptörlerinin varlığı insan sol ventrikül dokusunda gösterilmiştir fakat henüz kalp fonksiyonu üzerine etkisi bilinmemektedir (92, 93). Melatoninin embriyonik kalp dokularında yüksek voltajla aktive olan kalsiyum akımlarını stimüle ettiği bilinmektedir (97). Bunun dışında;

atardamarlardaki melatonin reseptörleri termoregülasyon ile ilişkilendirilmiştir (98). Gün içinde melatonin alanlarda vazodilatasyon yolu ile distal vücut bölgelerinde vücut sıcaklığının düştüğü gösterilmiştir (99, 100). Tam olarak hangi reseptörün bu etkiye aracılık ettiği bilinmemektedir.

Melatoninin kan basıncı üzerine etki ettiği de bilinmektedir. Sağlıklı erkeklerde (101) ve hormon replasman tedavisi gören menopoz sonrası kadınlarda (102), 1 mg p.o. melatoninin ortalama arter kan basıncını yaklaşık 6 mmHg azalttığı görülmüştür. Aynı zamanda tip 1 diyabetik ergenlerde (103), esansiyel hipertansif hastalarda (104) ve gece hipertansiyonu olan hastalarda melatoninden sonra kan basıncında düşüş tespit edilmiştir (105). Bu etkide rolü olan melatonin reseptörü henüz tanımlanmamıştır.

Melatoninin, doğrudan bağlanma ve redistribüsyon ile kalmodulin degradasyonunu artırdığı gösterilmiştir, böylece hücre döngüsünü inhibe etmiş olur (79). Melatonin ayrıca, gen transkripsiyon aktivitesinin güçlü bir modülatörü olarak da görev yapar. Melatoninin merkezi veya periferik dokularda çok sayıda geni hedeflediği gösterilmiştir. Melatoninin, pars tuberalisteki saat genlerinin ekspresyonunu aşamalı hale getirerek mevsimsel fotoperiodik kontrole aracılık ettiği öne sürülmüştür. Melatonin sıçan retinasında integrin ve integrin-ilişkili protein kodlayan genlerin gen ekspresyonunu azaltırken, retina pigmenter hücrelerinde siklik adenzin monofosfat (cAMP) yanıt elementi bağlayan protein (CREB) gen ekspresyonunu artırır (106). Melatonin ayrıca Mybl1, Rasa1, Mllt3 ve Enigma homolog 2 gibi onkogenез ile ilgili genlerin ekspresyonu ve kalsiyum metabolizması üzerinde belirgin bir etki göstermiştir (107). Melatonin; 16S ribozomal RNA (mt-RNr2), sitokrom C oksidaz alt birimleri I ve II (mt-Co1, mt-Co3) ve NADH dehidrogenaz 1 (mt-Nd1; hepsinin artırılması) ve ATP sentaz alt ünitesi 6 (mt- ATP6; azaltılması) gibi mitokondriyal genlerin ekspresyonu üzerinde önemli bir etki gösterir (107).

2.2.9. Siklooksijenaz 2 (COX-2) İnhibisyonu ve Downregülasyonu

COX-2, araşidonik asitten elde edilen prostaglandinlerin (PG) biyosentezindeki iki ardışık adımı katalize edilen enzimdir. COX'un indüklenebilir izoformu olan COX-2, inflamatuvar yanıtta kritik bir rol oynar ve aşırı ekspresyonu, nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli kanser türleri dâhil olmak üzere birçok patoloji ile ilişkilendirilmiştir. Mayo ve ark., melatonin ve metabolitlerinin COX-2 ve iNOS aktiviteleri üzerindeki baskılayıcı etkisini lipopolisakkarit (LPS) varlığında RAW264.7 makrofajları kullanarak araştırmışlardır (108). Ek olarak, Deng ve ark. Melatoninin, RAW264.7 hücrelerinde COX-2 ve iNOS'un LPS ile indüklenen protein seviyeleri ve promotor aktivitelerini zaman-konsantrasyon bağımlı olarak inhibe ettiğini göstermiştir (109). Serotonin ve triptofan ise melatonin gibi indol türevi olmalarına rağmen aynı etkiyi göstermemektedirler.

2.2.10. Bağışıklık Sisteminin Düzenlenmesi B hücreleri, T hücreleri, NK Hücreleri, Timositler ve Kemik İliği

Melatoninin epifiz bezi dışında retina, böbrekler ve sindirim sisteminde üretildiği bilindiğinden (110), bağışıklık sisteminin de vücudun farklı organlarında üretilen melatoninden etkilenebileceğini düşünülmektedir. Bunlara ek olarak, insan periferik kan mononükleer hücrelerinin biyolojik olarak uygun miktarda melatonin sentezlediği bulunmuştur (111). Bu durum, bağışıklığın düzenlenmesinde melatoninin potansiyel intrakrin ve parakrin rolünü gösterir. Melatoninin, kendi reseptörleri aracılığı ile bağışıklık sisteminin hücrelerini etkilediğine inanılmaktadır. Lökositlerde melatoninin membran ve nükleer reseptörlerinin ikisi de tanımlanmıştır. Membran reseptörleri daha çok CD4⁺ T lenfositlerinde, ayrıca CD8⁺ T ve B hücrelerinde de tanımlanmıştır (112). Melatonin, reseptörleri aracılığı ile, uyarılmış lenfositlerin proliferatif yanıtını modüle eder. Diğer taraftan, melatonin, nükleer melatonin reseptörü aracılığıyla insan periferik kan mononükleer hücrelerinin sitokin üretimini uyandır.

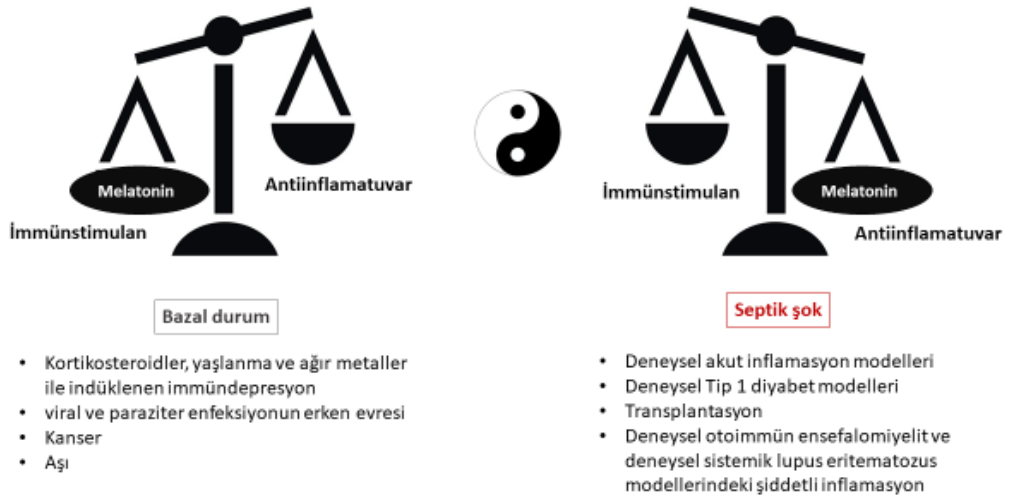
Melatonin uygulandığında faredeki dalak hücrelerinin Konkanavalin A ve LPS'ye olan mitojenik yanıtının arttığı görülmüş olup, kısmen de olsa fagositoz ve antijen sunumundaki artışında bu etkiye katkısı olduğu düşünülmektedir (112). Başka bir çalışmada da melatonin splenik makrofajlar tarafından T hücrelerine antijen sunumunu, MHC sınıf II ekspresyonunda ve proinflamatuvar sitokinler IL-1 ve TNF- α sentezinde eş zamanlı bir artış ile geliştirmiştir. Ek olarak, melatoninin Th1 fenotipine doğru T hücresi farklılaşmasını yönlendirmek için IL-12 üretimini indüklediği gösterilmiştir.

Melatoninin bağışıklık sistemini indükleyen etkisine dalak, timus, lenf nodları ve kemik iliğindeki sitokinlerin gen ekspresyonunun düzenlenmesinin aracılık ettiği düşünülmektedir. Melatonin ile tedavi edilen farelerde; peritoneal makrofajlarda, M-CSF, TNF- α , TGF- β ve SCF gen ekspresyonu artarken, dalak hücrelerinde IL-1 β , IFN- γ , M-CSF, TNF- α ve SCF artmıştır. Diğer çalışmalarda, melatonin alan insanlarda NK hücre aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (113). Melatoninin bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunun yanı sıra, farelerin kemik iliğinde NK hücrelerinin ve monositlerin üretimini artırdığı da gösterilmiştir (114). Melatonin ayrıca, fare kemik iliğinde prekürsör B hücrelerinin hayatta kalmasını destekler (115). Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde melatoninin hematopoez, immün hücre üretimi ve fonksiyonu modülatörü olduğu görülür. Melatoninin sitokin üretimini, fagositozu, NK hücre aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Melatoninin aynı zamanda immün cevabı yardımcı T hücre tip 1 (Th1) profiline doğru kaydırır. Melatoninin multipl skleroz ve romatoid artrit in hayvan modellerinde Th1'e bağlı inflamatuvar yanıtı şiddetlendirdiği gösterilmiştir. Tüm bu verilerin aksine; abartılı immün yanıt durumunda ise melatoninin tersine davranış sergilediği birçok çalışmada gösterilmiştir. Melatonin, akciğer inflamasyonu ve havayolu hiperaktivitesi olan sıçanlarda nötrofil infiltrasyonu ve inflamatuvar yanıt seviyelerini düşürmüştür (116, 117). Deneysel akut pankreatitte de nötrofil infiltrasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (118). Sıçanlarda geçici fokal serebral iskemi sonrasında reperfüzyon üzerine melatonin uygulandığında dolaşımdaki nötrofillerin ve makrofajların/monositlerin beyine hareketinin azaldığı ve mikroglial aktivasyonun inhibe olduğu gösterilmiştir (119). Kemotaksise ek olarak

endotele yapışma ve permeabilite, hedefe yönelik immün hücre toplanmasında rol oynayan kilit süreçlerdir. Melatonin uygulandığında lökatrien B₄ kaynaklı endotel hücre hiperadevizitesinin azaldığı görülmüş ve bu durumun nötrofil ile vasküler hücre interaksyonu kapasitesinin azalması ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (120). Melatonin fare Raw 264.7 makrofaj hücre dizisinde LPS ile indüklenen COX-2 ve iNOS protein seviyelerinin artışı baskılamıştır (109). Melatonin ve türevi AFMX insan pulmoner fibroblastlarında (121) ve periferik kan nötrofillerinde (83) LPS ile indüklenen IL-8 üretimini de baskılamıştır.

Melatoninin antiinflamatuvar aktivitesini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Melatoninin sıçanlarda LPS ve peptidoglikanın venöz infüzyonundan sonra uygulandığında oksidatif hasarı azalttığı ve IL-6 mRNA ekspresyonunu baskı altına aldığı (122) ayrıca sıçanda intraserebroventriküler bölgelere LPS enjeksiyonundan sonra TNF- α , IL-1 β ve oksidatif stres mediyatörlerinin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (123). Hamile farelerde, maternal serum ve fetal beyindeki LPS ile indüklenen TNF- α artışı da azaltmıştır (124). Sıçanlarda fungal infeksiyon ile indüklenen sepsis sonrasında, 15 gün boyunca 200 μ g/kg melatonin uygulandığında artmış IL-6 seviyesi azalmış ve kandidanın dolaşımdan temizlenmesi için gereken süre %15 oranında kısalmıştır (125). LPS enjeksiyonu ile indüklenen sıçan akut septik akciğer yaralanması modelinde melatonin IL-10'u artırırken, LPS ile uyarılan pulmoner lökosit infiltrasyonunu, doku malondialdehit, miyeloperoksidaz ve TNF- α düzeylerini düşürmüştür (126). TNF- α seviyesini azaltma ve oksidatif stresi baskılama etkisi çekal ligasyon ve ponksiyon (CLP) modeliyle indüklenen sıçanlarda da gösterilmiştir (127). 1-100 mg/kg dozlarında melatonin uygulanan farelerde LPS ile indüklenen TNF- α üretiminin azaldığı fakat mezenterik kan akımını azalışı üzerine olumlu etkisi olmadığı görülmüştür (128). Söz konusu çalışmada melatonin çözücüsü olarak alkol kullanılmıştır. LPS enjeksiyonundan 30 dk önce ve 60 dk sonra 10 mg/kg, i.p. melatonin enjeksiyonu, farelerde LPS ile indüklenen proinflamatuvar sitokin TNF- α , IL-12 ve IFN- γ seviyelerindeki artışı engellemiş ve antiinflamatuvar sitokin IL-10 salıverilmesini desteklemiştir. Melatonin karaciğer ve beyinde de nitrit/nitrat oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu (LPO) inhibe etmiştir (129).

Sepsis, vasküler düz kasta NA, adrenalin, serotonin ve kalsiyum gibi çeşitli vazokonstriktörlerin kasılma yanıtında bozulma ile ilişkili olup vasküler hiporeaktivite gözlenir (130). Bir çalışmada da LPS enjeksiyonundan 30 dk önce, 1 ve 3 saat sonra 30 mg/kg i.p. melatonin uygulanan sıçanlarda LPS ile indüklenen vasküler hiporeaktivite yanıtının düzeldiği görülmüştür (131).



Şekil 2.5. Melatonin ve immün sistem (Carrillo-Vico A. ve ark. (152)'dan uyarlanmıştır)

Melatoninin antiinflamatuvar etkisinin kısmen IL-4 üreten Th2 lenfositlerinin indüksiyonuna bağlı olduğuna inanılmaktadır; böylelikle Th1 hücrelerinin işlevini engellemiş olur (132). Melatoninin ülseratif kolitli hayvan modellerinde (133), deneysel pankreatitte (134) ve septik şokta koruyucu olduğu gösterilmiştir (135). Melatonin reseptörlerinin dağılımı ve bağışıklık sistemi tarafından sentezi, melatonin ve bağışıklık sistemi ilişkisini destekler. Melatonin, esas olarak sitokinlerin modülasyonunu ve oksidatif stres üretimini içeren kombine mekanizmalar yoluyla bağışıklık sisteminin hem doğal hem de spesifik yanıtı üzerine etki eder. Carrillo-Vico A. ve ark. bir derlemede, melatoninin bazal veya immünsüprese koşullar altında immünstimulan etki göstererek virüsler ve parazitler gibi faktörlere karşı daha etkili bir erken bağışıklık tepkisi için önceden aktive edilmiş bir durum sağladığını; ancak septik şok gibi şiddetli bir bağışıklık yanıtı varlığında antiinflamatuvar etki gösterdiğini

bildirmişlerdir. Bu nedenle, bağışıklık sistemi üzerindeki pleiotropik, çeşitli ve karmaşık etkilerini en doğru şekilde tanımlamak amacıyla melatonini “immünolojik tampon” olarak tanımlamışlardır (şekil 2.5. , 152)

2.2.11. Melatonin ve Serbest Radikaller

Serbest radikaller eşleşmemiş değerlik elektronu bulunduğundan çok kararsız ve oldukça reaktiflerdir. Reaktif oksijen türleri (ROS) lipitlere, proteinlere ve DNA'ya zarar verebilen serbest radikallerdir ve bu nedenle hücrelerin fonksiyonel ve yapısal değişikliklerine neden olurlar (42). Antioksidanlar ise serbest radikallerle reaksiyona girip nötralizasyon ile hücreleri korumaya yardımcı olur (40). Hücre içinde birçok metabolik süreçte organizmada ROS oluşur ve bunlara karşı hücrelerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri bulunur. ROS'a karşı savunmada yer alan klasik enzimler arasında SOD, CAT (49) ve GPx bulunur. Nonenzimatik antioksidanlar, serbest radikal toplayıcılar, elektron donörleridir ve bu nedenle ROS'u doğrudan ortadan kaldırarak toksisitesini nötralize edebilirler (138). Melatonin; oldukça güçlü olduğu bilinen E vitamini, askorbik asit ve glutatyondan (GSH) bile daha güçlü bir serbest radikal temizleyicidir (139). Melatonin lipofilik bir molekül olduğu için her hücre kompartımanına kolayca girer ve nükleer DNA (39, 44), lipidler (140) ve proteinler (141) gibi moleküllerdeki oksidatif hasarı aktif olarak azaltır. Melatonin, serbest radikaller arasında en reaktif ve toksik olan hidroksil radikali de dahil olmak üzere birçok ROS'u doğrudan nötralize eder (136).

Melatoninin serbest radikallerle etkileşimi melatonin metabolitlerini oluşturur ve bu metabolitlerin bazıları da serbest radikal süpürücü etkilidir. Örneğin, hepatik metabolit olan 6-hidroksimelatoninin, serbest radikalleri etkili bir şekilde temizleyebildiği bildirilmiştir. Bu reaksiyonlar, hücreleri oksidatif hasara karşı korumak için melatoninin etkinliğini önemli ölçüde artırır. Melatonin, NO ve peroksinitrit (ONOO⁻) gibi reaktif nitrojen türlerini (RNS) nötralize edebilir ve temizleyebilir (142). Melatoninin bu antioksidan etkileri esas olarak melatoninin farmakolojik dozları (\geq nM) kullanılarak gözlemlenmiştir. Melatoninin fizyolojik bir antioksidan olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. Örneğin; epifiz bezi çıkarılmış

sıçanlarda serbest radikal oluşturan ajanlar uygulandığında oksidatif hasarın arttığı bildirilmiştir (143). Melatonin, diğer antioksidanlar ile sinerjik hareket ederek ve SOD, CAT ve GPx dâhil olmak üzere majör antioksidan enzimlerin sentezini uyararak dolaylı bir antioksidan işlevi de görmektedir (144). Melatonin reseptörlerinin de bu enzimlerin aktivasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (138).

Membran melatonin reseptörlerini aktive etmek için gerekli melatonin konsantrasyonları (20-160 pM) kan melatonin seviyeleri aralığındadır (141). Bu, fizyolojik melatonin seviyelerinin, organizmanın toplam serbest radikal süpürme kapasitesine katkıda bulunduğunu gösterir (143). Ayrıca NO sentaz gibi pro-oksidant enzimlerin de aşağı yönde regülasyonunu sağlayabilir (23). Aynı zamanda mitokondriyal solunum zincirindeki elektron sızıntısını azaltarak serbest radikal oluşumunu engelleyebilir (142).

2.2.12. Antioksidan Enzimlerin Düzenlenmesi

Melatonin, doğrudan serbest radikal süpürücü ve membran stabilizasyonu yapıcı etkilerine ek olarak, reaktif oksijen ara maddelerini üreten veya metabolize eden enzimleri etkileyerek de serbest radikallere karşı koruyucu etkinlik gösterir. Bu enzimler reaktif oksijen formlarını toksik ve aktif olmayan moleküllere, örneğin H_2O ile O_2 'ye dönüştürür. Melatoninin ayrıca antioksidan enzimlerin gen ekspresyonunu da etkilediği gösterilmiştir. Melatonin uygulanan sıçanların Harderian bezinde Cu-Zn-SOD ve de Mn-SOD için mRNA seviyeleri artmıştır(145). Aynı araştırma ekibi antioksidan enzimlerin gen ekspresyonu artışını fare beyin korteksinde de göstermişlerdir. Bir kere üretildikten sonra H_2O_2 , demir iyonu (Fe^{+2}) varlığında Fenton reaksiyonu yoluyla kolayca reaktif ve yıkıcı hidroksil iyonu (OH^-) haline dönüştürülebilir. Peroksidazlar ve CAT enzimi H_2O_2 'nin hücre ortamdan uzaklaştırılmasında rol oynar. En verimli enzim peroksidaz GPx'dir, sitosol ve mitokondride bulunur. Bu enzimin aktif bölgesinde selenyum (Se) bulunur. Elektronları H_2O_2 'ye (ve diğer peroksitlere) transfer etmek için substrat olarak indirgenmiş GSH kullanan GPx, böylelikle iki su molekülü oluşmasını sağlar. İkinci H_2O_2 metabolize edici enzim, CAT'dir; esas olarak peroksizomlarda bulunur. CAT aktif

bölgesinde ferrik iyon molekülü (Fe^{+3}) içerir ve iki H_2O_2 molekülünü bir su ve diatomik oksijen (O_2) molekülüne dönüştürür (147). Melatonin, hücrelerden H_2O_2 'yi çıkarmak için farmakolojik ve fizyolojik olarak GPx'in aktivitesini uyarır. Böylelikle GSH oksitlenmiş glutatyona (GSSG) dönüştürülür, GSSG daha sonra GSSG redüktaz enziminin varlığında GSH'ye geri indirgenir. Bu enzimin aktivitesi de melatonin tarafından uyarılır, böylece en önemli antioksidanlardan biri olan GSH'nin yenilenmesi sağlanır. GSH, serbest oksijen radikallerini temizler ve lipit süperoksitlerinin, lipit hasarı ürünlerinin dekompozisyonunda aktif rol oynar (39, 56, 90). Diğer organlarda olduğu gibi, kalp kasında da serbest radikallerinin zararlı etkisine karşı; SOD, CAT, GPx, GSSG-R ve GSH içeren bir enzim kompleksi bulunur (146, 148). Yukarıda belirtilen antioksidatif enzimlerin düşük aktivitesi nedeniyle, kardiyomiyositler serbest radikallerin etkisine özellikle duyarlıdır. Kalpteki SOD aktivitesi, karaciğerdeki %25-30'una karşılık gelir. GPx'in kardiyomiyositlerdeki aktivitesi, karaciğerdeki aktivitenin ancak %1-2'sine ulaşır ve ayrıca kardiyomiyositlerdeki GSH düzeyleri hepatositlerden birkaç kat daha düşüktür. Bu nedenle kalp, metabolizmaları sırasında yüksek miktarda serbest oksijen radikali üreten maddelerin etkisine özellikle duyarlıdır (150,151).

2.3. Hipotez

Melatoninin LPS ile indüklenen deneysel sepsis modelinde bozulan sıçan kalp fonksiyonu üzerine düzeltici etkileri vardır.

2.4. Amaç

Bu çalışmada; melatoninin LPS ile indüklenen deneysel sepsis modelinde sıçan kardiyak fonksiyon parametreleri kalp atım hızı, sol ventrikülün geliştirdiği basınç (LVDP), koroner akım rezervi, kasılma ve gevşeme kapasitesi üzerine etkisini araştırmak amaçlandı. Kalbin kasılma ve gevşeme kapasitesi basınç-zaman grafiğinin türevinin maksimum ($+dP/dt_{max}$) ve minimum ($-dP/dt_{min}$) değerleri alınarak hesaplandı. Ek olarak, melatoninin immünolojik parametreler üzerine etkisini

incelemek amacıyla sitokin düzeyleri (IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α) ve oksidatif stress düzeyi (TAS, TOS, OSI) *in vitro* düzeyde araştırıldı.

Ayrıca; melatoninin septik kalpteki immünolojik parametrelere olan etkisinin, immün yanıtın majör komponentleri karaciğer, dalak ve serumdaki etkisine paralel yönde olup olmadığını araştırmak amaçlandı.

3. YÖNTEMLER

3.1. DeneY Hayvanları

Kobay DeneY Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi'nden ağırlıkları 300 ± 70 g arasında değişen 66 adet erkek Wistar Albino Sıçan temin edildi. Sıçanlar, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı barınağında $21 \pm 2^\circ\text{C}$ 'lik sıcaklıkta, % 30-70 nem ve 12 saat karanlık/12 saat aydınlık döngüsü uygulanan ortamda barındırıldı. Beslenmeleri için *ad libitum* standart sıçan yemi ve çeşme suyu kullanıldı.

3.2. Etik Kurul İZni

Bu tez çalışması; T.C. Hacettepe Üniversitesi Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu tarafından, 52338575-74 sayılı yazı ve 20.06.2017 tarih, 2017/42-03 numaralı karar ile uygun bulunmuştur. DeneYler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.3. Çözelti ve İlaçlar

DeneYlerde melatonin (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, ABD), *Escherichia coli* O55:B5 suşuna ait lipopolisakkarit (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, ABD), (-)-isoproterenol hidroklorür (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, ABD), karbakol (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, ABD) ve kloralhidrat (MERCK KGaA, Darmstadt, Almanya) kullanıldı. (-)-isoproterenol hidroklorür ve karbakol çözeltileri, distile suda çözülerek hazırlandı. Dilüsyonlar stok çözeltilerden günlük olarak taze hazırlandı. Melatonin suda çözünmediği için (ethanol solübilitesi: 50 mg/mL); çözücüsü olarak % 99,8'lik etanolün distile suda dilüe edilen çözeltisi (Etanol 0,6 ml/kg) kullanılmıştır. Diğer tüm ilaç uygulamaları için vehikül ve çözücü olarak salin (NaCl 0.9%, 2,5 mL/kg) kullanıldı ve tüm ilaç uygulamaları intraperitoneal (i.p.) yoldan uygulandı.

LPS 4 mg/kg, melatonin 30 mg/kg ve kloralhidrat 400 mg/kg, i.p. dozlarında uygulandı. Langendorff perfüze kalp deneYlerine özgü olarak pıhtılaşmayı önlemek amacıyla anestezi sırasında 500 IU heparin i.p. uygulandı. Fizyolojik çözelti olarak

modifiye Krebs Henseleit (K-H); izole organ banyosu deneylerinde (mM; sodyum klorür 118, sodyum bikarbonat 25, potasyum klorür 4,7, kalsiyum klorür 2,5, magnezyum sülfat 1,2, monopotasyum dihidrojen fosfat 1,2, glikoz 11), Langendorff izole kalp perfüzyonu deneylerinde (mM; sodyum klorür 118, sodyum bikarbonat 24,8, potasyum klorür 4,7, kalsiyum klorür 1,3, magnezyum sülfat 1,2, monopotasyum dihidrojen fosfat 1,2, glikoz 11) 37 ± 2 °C 'de %5 CO₂, %95 O₂ ile gazlandırılarak kullanıldı.

3.4. Gruplar

In vitro izole organ banyosu (n=6), Langendorff izole kalp perfüzyonu (n=6) ve ELISA (n=6-8) deneyleri için ayrılan deney grupları aşağıdadır. Sonuçlar verilirken kontrol grubu "S", sepsis modeli "L", sepsis ve melatonin grubu "LM", melatonin grubu "M" olarak sunuldu.

Tablo 3.1. Deney Grupları

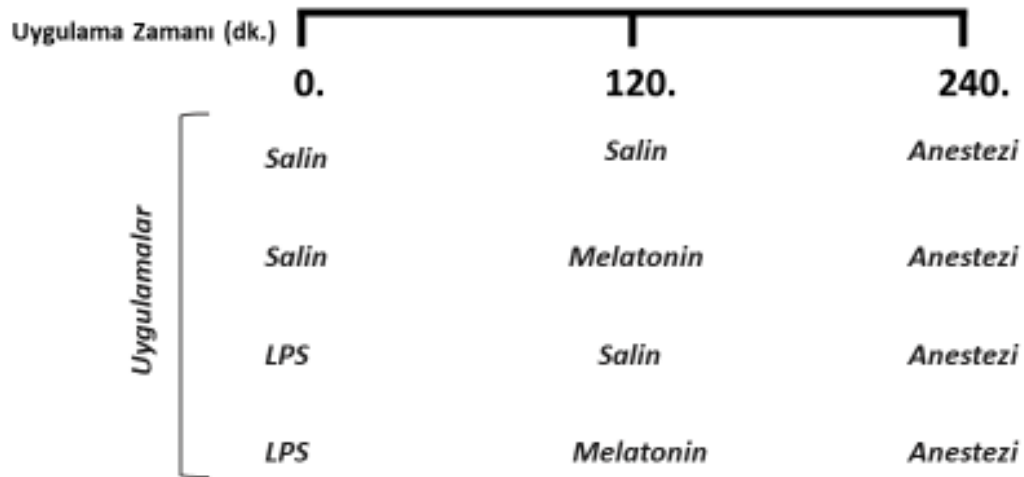
Gruplar		Uygulamalar	
Kontrol	S	Salin	Salin
Sepsis Modeli	L	LPS	Salin
Sepsis + Melatonin	LM	LPS	Melatonin
Melatonin	M	Salin	Melatonin

3.5. Protokol

Şıçanlar kontrol, sepsis, sepsis + melatonin, melatonin grupları olmak üzere rastgele gruplara atandı. 0. dk salin (2.5mL/kg, i.p.) verilen şıçanlara 120. dk salin veya melatonin (30 mg/kg) i.p. verildi. 0. dk LPS (4 mg/kg, i.p.) verilen şıçanlara 120. dk salin veya melatonin (30 mg/kg) i.p. verildi. Bütün şıçanlara 240. dk sonunda kloralhidrat (400mg/kg, i.p.) ile anestezi uygulandı (Şekil 3.1). Langendorff deneyleri

için ayrılan sıçanlara anestezi ile eş zamanlı olarak 500 ünite i.p. heparin uygulandı. Anestezi indüksiyonu sağlandıktan sonra forseps yardımıyla pedal refleksin yokluğu kontrol edildi. Kornea ve pedal reflekslerin yokluğu kontrol edilip anestezi derinliğinden emin olduktan sonra sıçanlar izole organ banyosunda kullanılmak üzere atriyum, ventrikül veya Langendorff perfüzyonunda kullanılmak üzere tüm kalp izolasyonu için hızlıca sakrifiye edildi.

Bunun için Ksifoid bulundu ve bu noktadan ventral olarak sagittal insizyon ile toraks ön duvar intratorasik organları net görebilecek şekilde, yaprak şeklinde kaldırılarak sabitlendi. Timüs eksize edilerek arkus aorta ve dalları görüldü. Asendan aorta arkus aortanın hemen proksimalinden *tweezer* ile tutuldu ve aorta kavis yaptığı yerden makas yardımıyla kesildi. O plandan kalbin arkasına geçilerek kalp, etrafındaki dokulardan, kalp bölümlerine zarar gelmeyecek şekilde eksize edildi ve daha sonra buz ile soğutulmuş, %95 O₂ - %5 CO₂ gaz karışımıyla gazlanan modifiye K-H çözeltisi içeren petri kabına alındı.



Şekil 3.1. Deney protokolü zaman çizelgesi.

3.5.1. *In vitro* Organ Banyosu Düzeneginde İzole Bütün Atriyum ve Papiller Kas Fonksiyonunun İncelenmesi

Göğüs boşluğu açılıp spontan atan kalp çevre dokulardan izole edildikten sonra ana damarlarla olan bağlantıları asendan aort hizasından kesilerek kalp çıkarıldı. Kalp, +4°C'de %95 O₂ - %5 CO₂ ile havalandırılan modifiye K-H solüsyonu bulunan petri kabına alındı ve burada sağ ve sol atriyum birlikte ventriküllerden ayrılarak her iki uca takılan ipler yardımı ile dikey olarak izometrik kuvvet transdüserine asıldı. Taze solüsyon ile yıkandıktan sonra istirahat gerimi 0,5- 0,75 g olarak ayarlandı.

Petri kabında kalan sol ventrikül göz ile ayırt edilerek ön duvardan dikey bir şekilde kesildi, arka duvarda bulunan sol ventrikül papiller kasın iki ucundan ayrı ayrı dikkatlice bağlandıktan sonra kasa herhangi bir gerim uygulamadan ventrikül duvarından hassas bir şekilde izole edildi. Kalbin anatomik duruşu referans alınarak insersiyosu yukarıdan, orijini aşağıdan asılı olacak şekilde dikey olarak izometrik kuvvet transdüserine bağlandı. İzole organ banyosuna asılan papiller kas taze solüsyon ile yıkandıktan sonra istirahat gerimi 0,5- 0,75 g olarak ayarlandı.

Hazırlanan izole dokuların bir ucu tutucularda (hook) olacak şekilde 20 ml hacminde, içinde sıcaklığı 37±2°C aralığında tutulan %95 O₂ - %5 CO₂ karışımı ile sürekli gazlandırılan Modifiye K-H solüsyonu olan organ banyolarına yerleştirildi. Diğer uçları ise transdüserine bağlandı.

İzole dokular 45 dakikalık dengeleme periyodunda asıldıkları andan itibaren her 15 dakikada bir taze solüsyon ile yıkandı. Dengeleme periyodundan sonra organ banyosuna kümülatif konsantrasyonlardan sırasıyla izoproterenol ardından karbakol eklenerek dokuların bu ilaçlara yanıtları kaydedildi. Atriyum kasılması sırasındaki izometrik fark (gram, g), kasılma hızı (bpm, beats per minute, dakikadaki atım sayısı) BIOPAC MP150 (Goleta, California, USA) kullanılarak bilgisayara kaydedildi. İncelenen parametredeki farklılıklar başlangıç değerine göre değişim oranı hesaplanarak konsantrasyon-yanıt eğrileri elde edildi.

Papiller kas preparatına devamlı elektriksel alan stimülasyonu (EAS) uygulanacağı için papiller kas preparatı cam tutucunun ucundaki platin elektrodların

tam arasına gelecek şekilde yerleştirildi. Papiller kas preparatına frekansı 1 pps (pulse per second, saniyede 1 pulse), süresi 2 ms, gerilimi 80 volt olan EAS devamlı olarak uygulandı. Papiller kasın EAS sonucu kasılması ile oluşan izometrik fark BIOPAC MP150 (Goleta, California, USA) kullanılarak bilgisayara kaydedildi.

İsoproterenol cevapları alındıktan sonra preparatlar 45-60 dakika boyunca ve her 15 dakikada bir taze solüsyon ile yıkanarak dinlendirildi. Bu dönemden sonra her iki preparata artan dozda karbakol (10^{-10} M, 3×10^{-10} M, 10^{-9} M, 3×10^{-9} M ... 10^{-5} M, 3×10^{-5} M) uygulandı. İncelenen parametrelerdeki değişiklikler yukarıdaki anlatıldığı şekilde kaydedildi. Kayıtlar alınırken verilen herhangi bir doz sonrası artan kasılma veya hız plato çizene kadar beklendi ve sonrasında diğer doza geçildi. Karbakol cevapları alındıktan sonra deney sonlandırıldı.

3.5.2. Sabit Basınç Langendorff İzole Kalp Perfüzyonu Deney Düzenegi

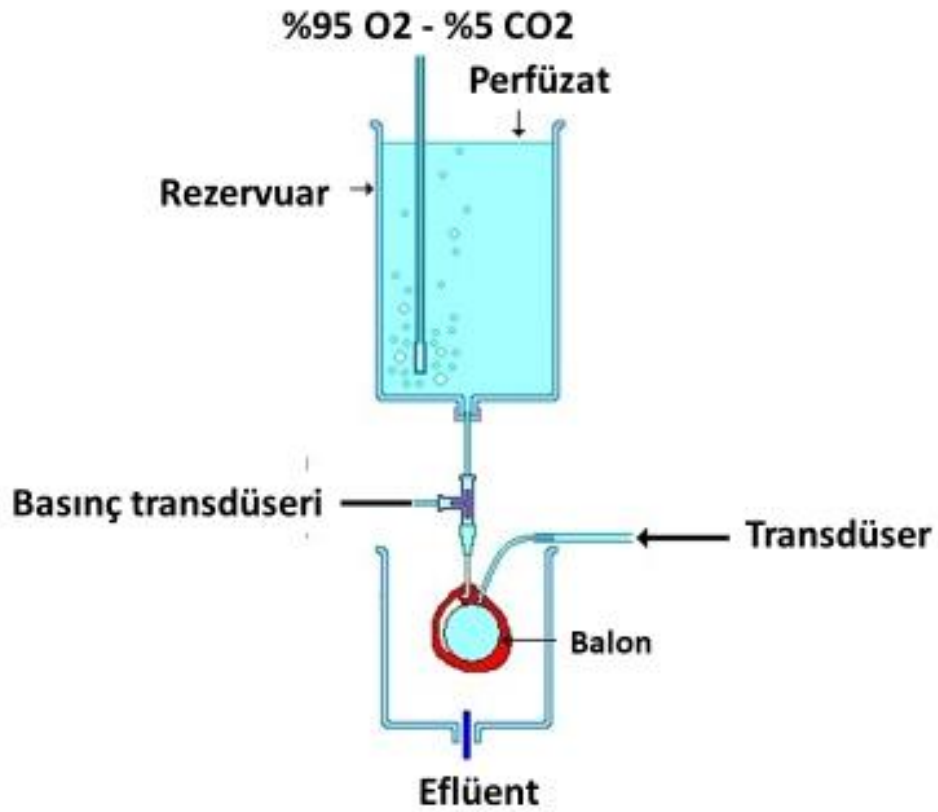
Langendorff izole memeli kalbinin mekaniğini incelemek için geliştirilmiş bir tekniktir ve kalp kasılma fonksiyonu, koroner kan akımı regülasyonu ve kardiyak metabolizma gibi kalbin temel fizyolojisi hakkındaki anlayışı değiştirecek çok sayıda veri sağlar (10, 41). Yöntemin temel prensibi, kalp perfüzyonu ve kardiyodinamik fonksiyonun muhafaza edildiği sırada kalbin *ex vivo* çalışılabilirdiği bir yöntem geliştirmektir. Perfüzat, ister tam kan ister K-H gibi fizyolojik sıvılar ile asendan aortaya sokulan bir kanül yolundan kalbe gönderilir. Asendan aortadan akan perfüzat basıncı retrograd doğrultuda akarak aortik valfin kapanmasına ve böylelikle perfüzatın koroner arterlere yönlenmesine neden olur. Akışın yönü daha sonra arterioller, kılcal damarlar, venöz sistem ve son olarak koroner sinüs içinden sağ atriyumuna doğru *in vivo* kan akımını takip eder. *In vivo* kalpten farklı olarak kalp boşlukları deney boyunca boş kalır (Şekil 3.2).

Langendorff modelinde izole kalbi perfüze etmek için sabit basınç ve sabit akım olmak üzere iki farklı yöntem tanımlanmıştır. Sabit basınç yönteminin düzenegi temel olarak kalpten 100 cm yüksekteki perfüzat rezervuarı, etrafı ısı ceketini ile sarılmış sarmal (coil) ve sıcaklığı sabit tutan ısı sirkülatör pompa, hava tuzağı (bubble trap), basınç transdüserinden oluşur. Rezervuardan çıkan perfüzat önce ısı ceketine

uğrayarak ısınır, daha sonra hava tuzağı ile sistemdeki olası hava uzaklaştırılır. Bunun amacı koroner arterlerde oluşabilecek hava embolisini önlemektir. Hava tuzağından kanüle giderken perfüze basıncı transdüser ile kaydedildikten sonra perfüze asendan aortada ters yönde ilerler. Aort kapağı kapalı olduğu için perfüze ilerleme yolu yalnızca koroner arterler olur. Koroner venöz dönüş ile sağ atriya gelen perfüze dışarı akar. Böylelikle kalp perfüze olur. Bu tez çalışmasında sabit basınç perfüzyonu yöntemi kullanılmıştır.

Yukarıdaki protokole anlatıldığı şekilde izole edilen kalp buzla soğutulmuş Modifiye K-H solüsyonu içeren petri kabına alındı. İki *tweezer* yardımı ile aorta en distalinden tutulup Langendorff düzeneğinin kanülüne yerleştirildi. 2.0 ipek ligatür ile tespit edildi. Sabitleme yapılırken kanülün aort kapağını geçip sol ventriküle girmemesine ve ligatürün pulmoner arteri kapatmamasına dikkat edildi. Modifiye KH solüsyonu ile 60-65 mmHg (81,6-88,4 cm H₂O) basınç altında perfüze edilmeye başlandı. Sol atriyum katarakt makası ile aurikuladan insize edilerek atriyum boşluğuna ulaşıldı. Açığa çıkan mitral kapaktan ucunda lateks bir balon olan polipropilen kanül geçirilerek, balon sol ventriküle yerleştirildi. Balon diyastol sonu basıncı 2-6 mmHg olacak şekilde şişirildi ve kalp 60 dk dinlenmeye bırakıldı. Dinlenme süresince basıncı 60-65 mmHg sabit basıncında tutabilmek için hazneye solüsyon eklemeleri yapıldı. 10., 20., 30. dakikalarda 1 dakika boyunca kalpten sızan perfüze (eflüent) mini beherde toplandı ve mezür yardımı ile ml/dk cinsinden koroner akım hızı ölçüldü. 40. dakikanın sonunda deneylere son verildi.

Sol ventrikül içi basınç değerleri Biopac Systems MP150, Biopac BSL 3.7 ile bilgisayara kaydedildi ve AcqKnowledge 4.2 yazılımı araçları kullanılarak sol ventrikülün geliştirdiği basınç (LVDP), basınç eğrisinin 1 dakikadaki frekansı kullanılarak kalp atım sayısı ve basınç zaman grafiğinin türevinin maksimum ve minimum değerleri (+dP/dt_{max} ve -dP/dt_{min}) hesaplandı.



Şekil 3.2. Langendorff deney düzeneği (153 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır)

3.5.3. ELISA: Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması

Sıçanlardan kalpte ventriküllerin tamamı, karaciğerin sağ alt lobundan bir parça ve dalak Eppendorf tüplere alındı. Jelli vakumlu serum tüplerinde kanlar 3000 devirde +4°C'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi ve ayrılan serum Eppendorf tüplere konuldu. Çıkarılan tüm örnekler alındıktan hemen sonra derin dondurucuda (-80°C) analizler gerçekleştirilinceye kadar saklandı.

Kalp, dalak ve karaciğer dokuları soğuk fosfat tamponu (pH 6-7) eklenerek homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar, oda sıcaklığında 15 dakika boyunca 10.000 devir/dakikada santrifüj edildi. Santrifüjden sonra oluşan süpernatantlarda ticari kitler kullanılarak ELISA cihazı (Zenyth 200 rt) içinde aşağıdaki biyobelirteçler ölçüldü.

3.5.4. ELISA: Biyokimyasal Analizler

Kalp, karaciğer ve dalak doku homojenatlarında, total antioksidan düzeyi (TAS) Rel Assay marka ticari kit (Rel Assay Kit Diagnostics, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar dokular için mmol Trolox equiv./g protein, serum için mmol Trolox equiv./L olarak ifade edildi. Total oksidan status (TOS) düzeyi de aynı marka Rel Assay ticari kit kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar dokular için $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv. /g protein, serum için $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv. /L olarak ifade edildi (154, 155). Serum, kalp, karaciğer ve dalak homojenatlarında TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17 düzeyi Elabscience marka ticari kit kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar dokular için $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv. /g protein, serum için $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv. /L olarak ifade edildi (154, 155).

3.5.5. ELISA: Oksidatif Stres İndeksi

Oksidatif Stres İndeksi (OSI), TOS'un TAS değerine oranı olarak tanımlanır. Bulunan değerlere göre aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$OSI \text{ (arbitrary unit, AU)} = TOS/TAS$$

3.5.6. ELISA: TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-17 Düzeylerinin Ölçümü İçin Test Prensipleri

Kullanılan ELISA kiti, Sandwich-ELISA prensibidir. Bu kitte sağlanan mikro ELISA plakası, önceden sıçan TNF- α 'sına özgül bir antikor ile kaplanmıştır. Standartlar ve örnekler mikro ELISA plakası kuyucuklarına eklendi ve buralarda bulunan spesifik antikor ile birleşmesi sağlandı. Daha sonra, TNF- α ve Avidin-Horseradish Peroksidaz (HRP) konjügatı için spesifik bir biyotin ile tespit antikorunu, her bir mikro plaka kuyusuna art arda eklendi ve enkübasyona bırakıldı. Serbest bileşenler yıkandıktan sonra substrat solüsyonu her bir kuyucuğa eklendi. Bu reaksiyonda sadece sıçan TNF- α , biyotin ile tespit antikorunu ve Avidin-HRP konjügatı içeren kuyucukların mavi renkte görünmesi beklenir. Daha sonra enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon sona erdirildi ve renk sarıya döndü. Optik yoğunluk (OD), spektrofotometrik olarak $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ dalga boyunda ölçüldü. OD değeri, TNF- α 'nın

konsantrasyonu ile orantılı olduğundan, tüm numunelerin OD değerlerini standart eğri ile karşılaştırarak TNF- α konsantrasyonunu hesaplandı. Kullanılan kitler Elabscience (14780 Memorial Drive, Suite 216, Houston, Texas 77079) firmasından alındı. Yukarıda açıklanan şekilde kitlerin içerisinde bulunan Elabscience marka kitlere özgü prosedür rehberine uygun olarak diğer IL-1 β , IL-6 ve IL-17 sitokin ölçümleri için de aynı prensipte deneyler yürütüldü ve hesaplamalar yapıldı (155).

3.6. Verilerin Değerlendirilmesi

Veriler aritmetik ortalama \pm standart hata (S.H.) olarak ifade edildi. Öncelikle verilerin normal dağılım gösterdiği test edildi. Verilerin istatistiksel analizi tek yönlü ANOVA sonrası *post hoc* Bonferroni testi ve *post hoc* Tukey yapıldı. İki yönlü ANOVA sonrası *post hoc* Dunnett testi ve *post hoc* Tukey testi yapıldı. GraphPad programı tarafından önerilen en güçlü *post hoc* testler tercih edildi. Hesaplanan *P* değerinin 0,05'den küçük olduğu durumlarda farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edildi. N sayısının eşit olmadığı durumlarda *post hoc* Bonferroni testi, belli bir veri grubuna göre (Şekil 4.1.1, 0.dk'daki veriye göre) karşılaştırma yapılırken *post hoc* Dunnett testi, tüm gruplar arasındaki karşılaştırma için *post hoc* Tukey kullanıldı.

4. BULGULAR

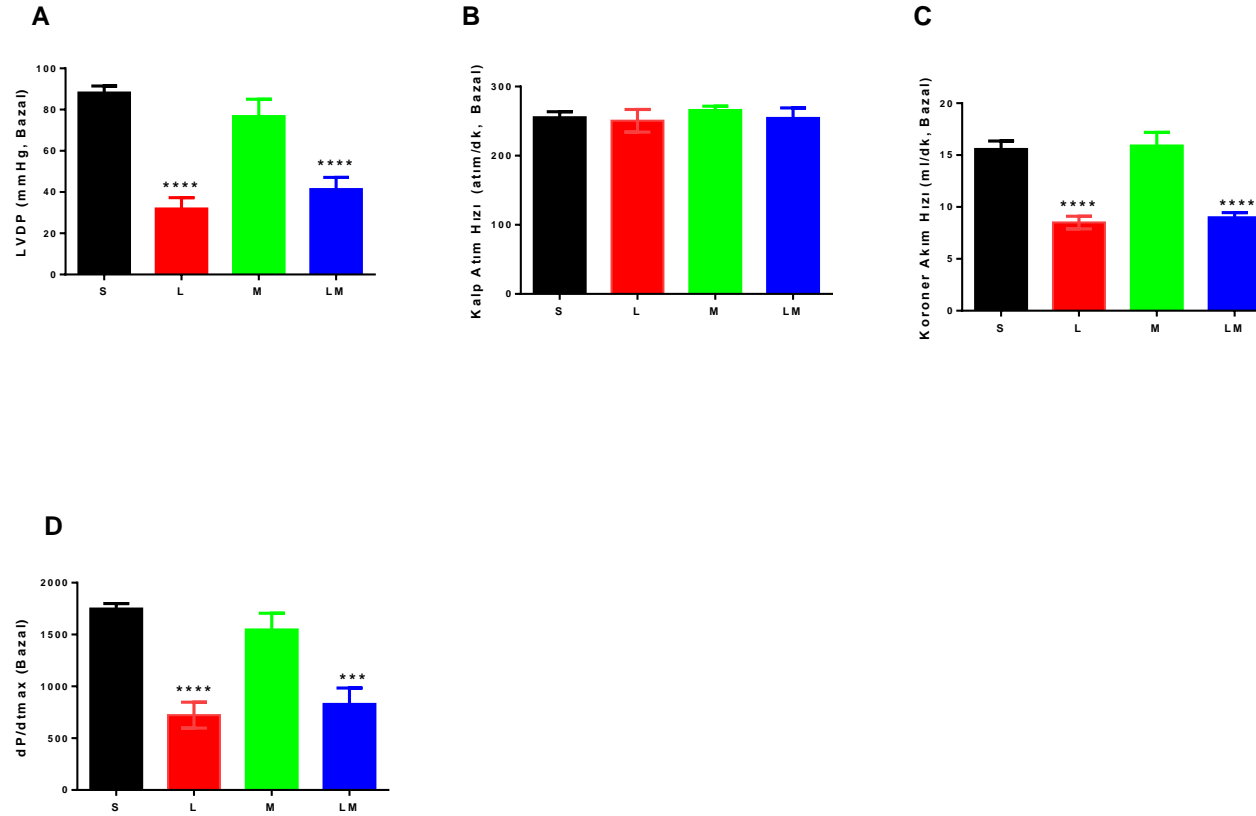
4.1. Langendorff Düzeninde Çalışan Kalpte Yapılan Ölçümler

Langendorff düzeninde çalışan kalpte yapılan LVDP, kalp atım hızı, koroner perfüzyon hızı, dP/dt_{max} ve dP/dt_{min} bazal değerleri tablo 4.1'dedir. Gruplar arasındaki anlamlı farklılık Şekil 4.1'de belirtildi.

Tablo 4.1. Langendorff düzeninde çalışan kalbin fonksiyonel ölçümlerinin bazal değerleri

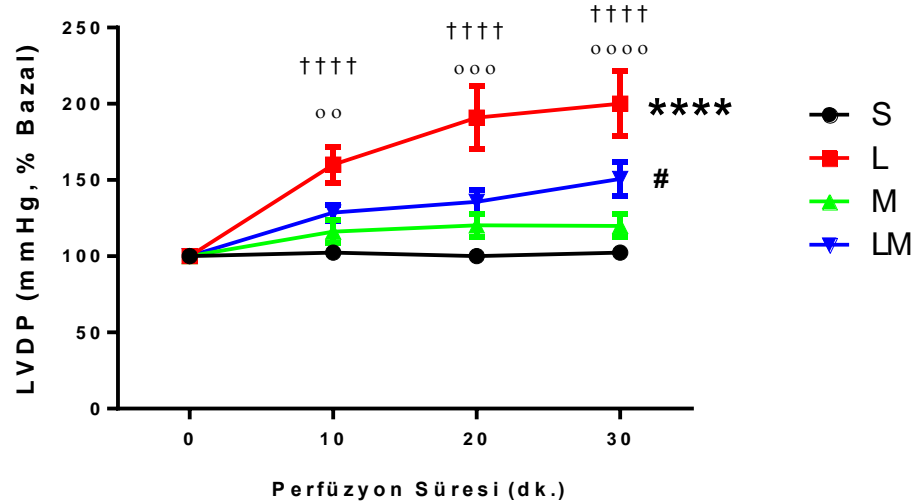
Bazal $\pm SH$	Salin	LPS	Mel	LPS+Mel
LVDP (mmHg)	88 \pm 3,2	32 \pm 5,3*	77 \pm 8,1	41 \pm 5,6
Kalp Atım Hızı (atım/dk)	256 \pm 8,2	251 \pm 16	266 \pm 5,5	255 \pm 15
Koroner Perfüzyon Hızı (ml/dk)	16 \pm 0,77	8,5 \pm 0,61*	16 \pm 1,3	9 \pm 0,47
dP/dt_{max}	1750 \pm 50	722 \pm 125*	1549 \pm 158	831 \pm 154
dP/dt_{min}	-1282 \pm 54	-341 \pm 74*	-1141 \pm 161	-492 \pm 103

Kalbin yukarıda belirtilen fonksiyonları üzerine bazal değerlerde LPS verilen sıçanlarda kalp atım hızı hariç tüm gruplarda anlamlı değişiklik gözlemlendi (Şekil 4.1). Sol ventrikülün geliştirdiği basınç değeri LPS uygulanmış sıçanlarda, salin grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,0001$). Kalp atım hızının bazal değerinin tüm gruplarda benzer düzeyde olduğu görüldü. Koroner perfüzyon hızı LPS uygulanmış sıçanlarda salin grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,0001$). dP/dt_{max} bazal değeri LPS uygulanmış sıçanlarda, salin verilen gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,0001$). dP/dt_{min} bazal değeri LPS uygulanmış sıçanlarda mutlak değer olarak bakıldığında anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,0001$).



Şekil 4.1. Langendorff deney düzenğinde ölçülen LVDP (A), kalp atım hızı (B), koroner akım hızı (C), dP/dt_{max} (D), dP/dt_{min} (E) parametrelerine ait bazal değerlerinin karşılaştırılması. Tek yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında (Kalp atım hızı hariç) anlamlı farklılık mevcuttur ($p < 0,0001$). *Post hoc* Holm-Sidak testi kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. **** $p < 0,0001$ S'ye göre anlamlı farklılık vardır. Tüm gruplarda $n=6$. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin, LVDP= Sol ventrikülün geliştirdiği basınç, dP/dt_{max} = Sol ventrikül maksimum basınç artışı, dP/dt_{min} = Sol ventrikül maksimum basınç azalması).

4.1.1. LPS ve Melatoninin Sol Ventrikülün Geliştirdiği Basınç (LVDP) Üzerine Etkileri



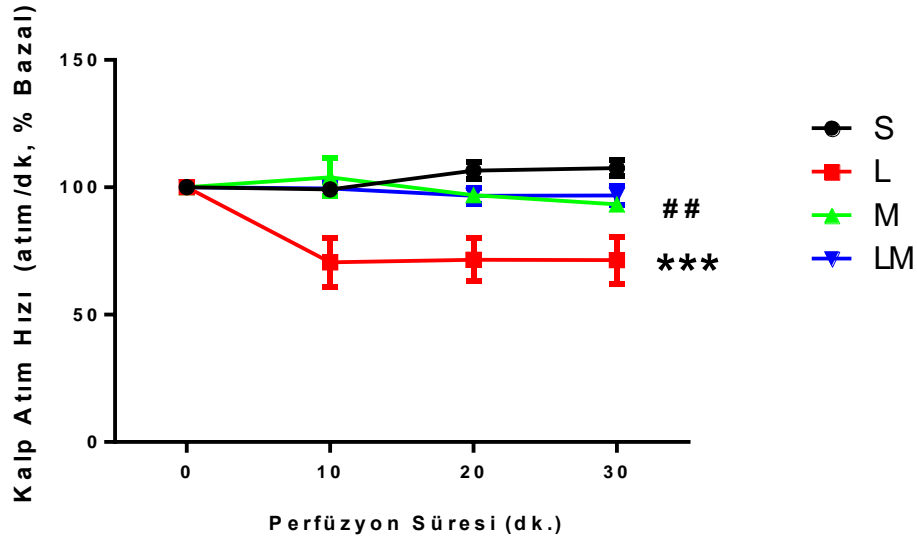
Şekil 4.1.1. LVDP'nin bazale göre değişimi. İki-yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur ($p=0,0001$). *Post hoc* Tukey (gruplar arasındaki farklılık) ve *post hoc* Dunnett (0.dk'ya göre farklılık) testleri kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. **** $p<0,0001$; S'ye göre anlamlı farklılık vardır. # $p<0,05$ L'ye göre anlamlı farklılık vardır. †††† $p<0,0001$; L'de 0. dk'ya göre 10., 20., 30. dk'da anlamlı farklılık vardır. oooo $p<0,0001$; ooo $p<0,001$; oo $p<0,01$ LM'de 0. dk'ya göre 10., 20., 30. dk'da anlamlı farklılık vardır. Tüm gruplarda $n=6$. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin, LVDP= Sol ventrikülün geliştirdiği basınç)

Langendorff düzeninde çalışan izole kalpte 10., 20., ve 30.dk yapılan ölçümlerin bazale göre değişimleri grafiğe aktarıldı (şekil 4.1.1.). Sol ventrikülün geliştirdiği basıncın bazale göre % değişim oranı LPS uygulanmış sıçanlarda, perfüzyon süresi arttıkça salin grubuna göre anlamlı derecede arttı. Melatonin verilen LPS uygulanmış sıçanlarda LPS verilen gruba göre LVDP değişimi anlamlı derecede azalarak, salin grubuna yaklaştı. Yalnızca melatonin verilen grup ile yalnızca salin verilen grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Melatonin verilen LPS'li grup ile salin grubu arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi.

Yalnızca Melatonin ve yalnızca salin verilen sıçanlarda bazale göre 10., 20., 30.dk'larda fark gözlenmedi. Melatonin verilen LPS uygulanmış sıçanlarda 10. ve 20.

dk'lardaki bazale göre değişim, LPS uygulanmış sıçanlardaki 10. ve 20. dk'lardaki değişime göre daha az saptandı.

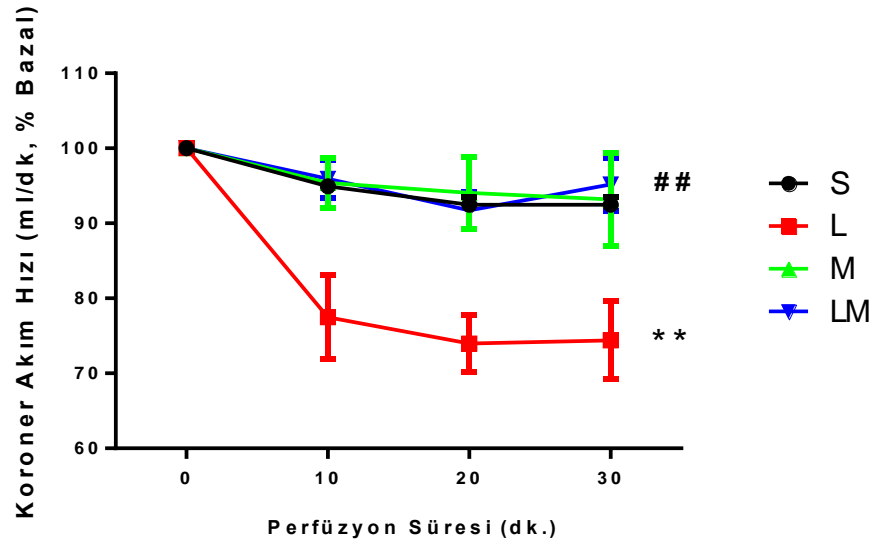
4.1.2. LPS ve Melatoninin Kalp Atım Hızı Üzerine Etkileri



Şekil 4.1.2 Kalp atım hızının bazale göre değişimi. İki-yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur ($P=0,0012$). *Post hoc* Tukey testi kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. *** $p<0,001$; S'ye göre anlamlı farklılık vardır. ## $p<0,01$; L'ye göre anlamlı farklılık vardır. Tüm gruplarda $n=6$. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin)

Langendorff düzeneğinde atmaya devam eden izole kalpte 30 dk süren perfüzyon süresince her 10 dakikada bir ölçülen kalp atım hızının bazal atım hızına oranı incelendiğinde LPS uygulanmış sıçanlarda 10. dk'dan itibaren salin grubuna göre anlamlı derecede azaldığı saptandı. Melatonin verilen LPS uygulanmış sıçanlarda ise LPS'li sıçanlara göre anlamlı derecede artış görüldü. Yalnızca melatonin verilen grup ile yalnızca salin verilen grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.1.2.).

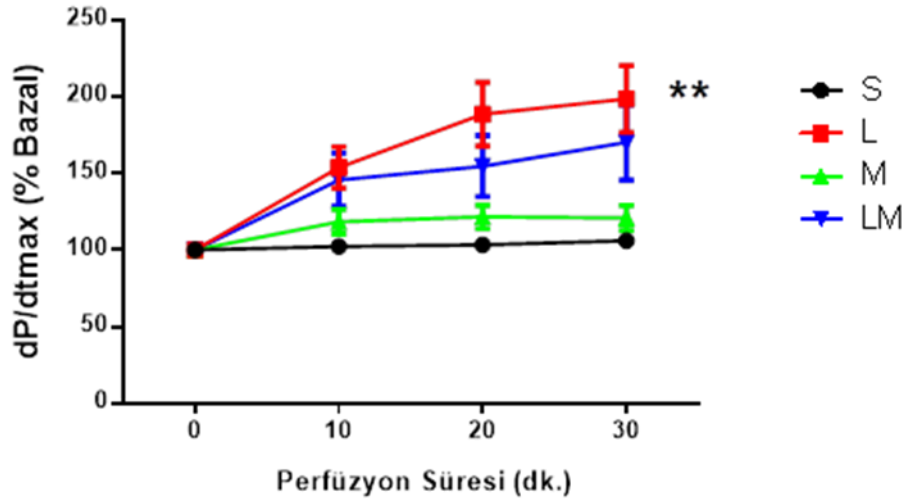
4.1.3. LPS ve Melatoninin Koroner Akım Hızı Üzerine Etkileri



Şekil 4.1.3. Koroner perfüzyon hızının bazale göre değişimi. İki-yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur ($P= 0,0021$). *Post hoc* Tukey testi kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. ** $p<0,01$; S'ye göre anlamlı farklılık vardır. ## $p<0,01$; L'ye göre anlamlı farklılık vardır. Tüm gruplarda $n=6$. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin)

Langendorff düzeneğinde çalışan kalpte koroner akım hızının perfüzyon süresi boyunca bazale göre değişimi incelendiğinde LPS uygulanmış sıçanlarda salin grubuna göre anlamlı derecede azalma saptandı. M, S ve LM gruplar arasında koroner akım değişimleri bakımından fark bulunmadı (Şekil 4.1.3.).

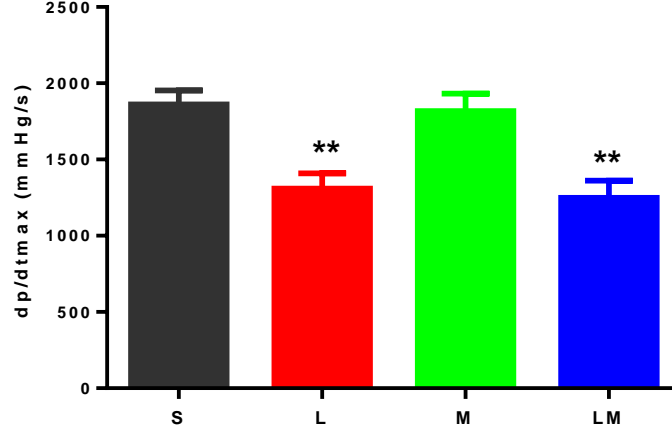
4.1.4. LPS ve Melatoninin Maksimum Türev Değeri Değişimi Üzerinde Etkileri (dP/dt_{max})



Şekil 4.1.4. dP/dt_{max} değerlerinin bazale göre değişimi. İki-yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur (P=0,0048). *Post hoc* Tukey testi kullanılmıştır. Veriler ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. **, p<0,01; S'ye göre anlamlı farklılık vardır. Tüm gruplarda n=6. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin, dP/dt_{max}= Sol ventrikül maksimum basınç artışı)

Langendorff sisteminde çalışan kalpte dP/dt_{max} değerlerinin 10., 20. ve 30. dk'da bazale göre değişimi incelendiğinde LPS uygulanmış sıçanlardaki dP/dt_{max} değerlerinin bazale göre değişimi, salin grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptandı (Şekil 4.1.4.). Melatonin verilen LPS'li grupta bu değişim azalıp saline yaklaşırsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

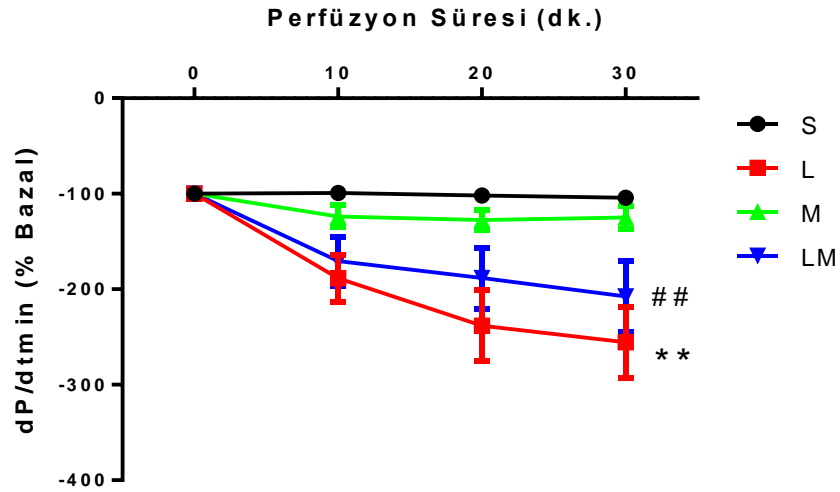
4.1.5. LPS ve Melatoninin 30. dk'da Maksimum Türev Değeri Üzerinde Etkileri (dP/dtmax)



Şekil 4.1.5. dP/dt_{max} 30. dk değerleri. Tek yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur (p=0,0004). *Post hoc* Tukey testi kullanılmıştır. Veriler ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. **, p<0,01; S'ye göre anlamlı farklılık vardır. Tüm gruplarda n=6. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin, dP/dtmax= Sol ventrikül maksimum basınç artışı)

Salin uygulanmış sağlıklı sıçanlara (1862 ± 90 mmHg·s⁻¹) göre; LPS uygulanmış sıçanlardaki +dP/dtmax değerleri (1309 ± 100 mmHg·s⁻¹) anlamlı derecede daha az bulundu (p=0,0025). Melatonin verilen sağlıklı sıçanlardaki (1818 ± 113 mmHg·s⁻¹) ile salin uygulanmış sağlıklı sıçanlardaki dP/dtmax değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı. Melatonin verilen LPS'li sıçanlardaki (1250 ± 113 mmHg·s⁻¹) ile LPS'li sıçanlardaki +dP/dtmax değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı (Şekil 4.1.5).

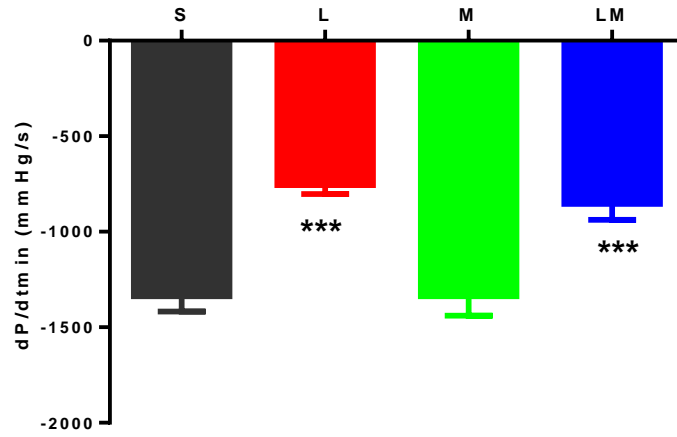
4.1.6. LPS ve Melatoninin Minimum Türev Değeri Değişimi Üzerinde Etkileri (dP/dt_{min})



Şekil 4.1.6. dP/dt_{min} değerlerinin bazale göre değişimi. İki-yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur ($P=0,0048$). *Post hoc* Tukey testi kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. **, $p<0,01$; S'ye göre anlamlı farklılık vardır. ## $p<0,01$; L'ye göre anlamlı farklılık vardır. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin, dP/dt_{min} = Sol ventrikül maksimum basınç azalması)

Langendorff sisteminde çalışan kalpte dP/dt_{min} değerlerinin 10., 20. ve 30. dk'da bazale göre değişimi incelendiğinde LPS uygulanmış sıçanlardaki dP/dt_{min} değerlerinin bazale göre değişiminin anlamlı derecede arttığı görüldü. Melatonin verilen LPS'li grupta bu değişim anlamlı olarak azaldı (Şekil 4.1.6.).

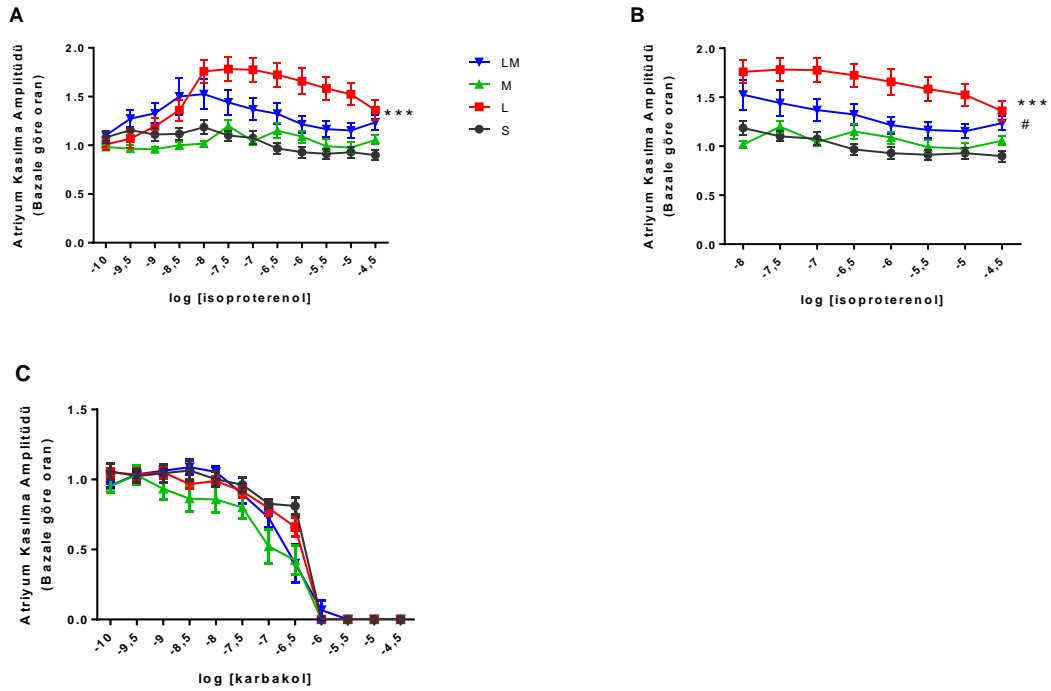
4.1.7. LPS ve Melatoninin Minimum Türev Değeri Üzerinde Etkileri (dP/dt_{min})



Şekil 4.1.7. dP/dt_{min} 30.dk değerleri. Tek yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında farklılık mevcuttur ($p < 0,0001$). *Post hoc* Tukey testi kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. *** $p < 0,001$; S'ye göre anlamlı farklılık vardır. Tüm gruplarda $n=6$. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin, dP/dt_{min} = Sol ventrikül maksimum basınç azalması)

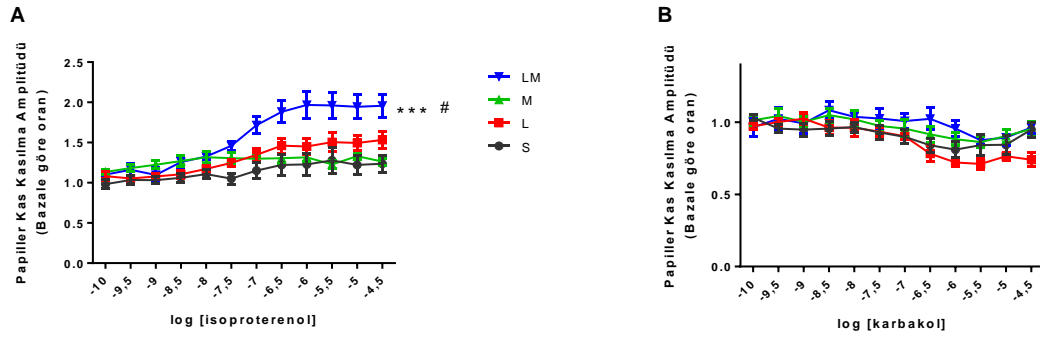
Langendorff sisteminde çalışan kalpte 30.dakikada yapılan ölçümlere göre dP/dt_{min} değerleri hesaplandı. Sağlıklı sıçanlara göre ($-1338 \pm 79 \text{ mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$), LPS uygulanmış sıçanlardaki ($-775 \pm 47 \text{ mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$) dP/dt_{min} değeri anlamlı derecede yüksek bulundu. Söz konusu anlamlı değişiklik mutlak değerde sağlıklı sıçanlara göre daha düşüktür. Melatonin uygulanmış sağlıklı sıçanlardaki değer ($-1337 \pm 101 \text{ mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$) ile salin uygulanmış sağlıklı sıçanlar dP/dt_{min} değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı. Melatonin uygulanmış LPS uygulanmış sıçanlardaki değer ($-854 \pm 84 \text{ mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$) ile LPS uygulanmış sıçanlardaki dP/dt_{min} değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı (Şekil 4.1.7).

4.2. İzole Organ Banyosu Deneyleri



Şekil 4.2.1 İzole organ banyosunda atriyumun isoproterenol (A,B) ve karbakol (C) izometrik gerim değişikliği yanıtları. İki-yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur ($p=0,0001$). *Post hoc* Tukey testi kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. ***, $p<0,001$; S'ye göre anlamlı farklılık vardır. # $p<0,1$; L'ye göre anlamlı farklılık vardır. Tüm gruplarda $n=6$. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin)

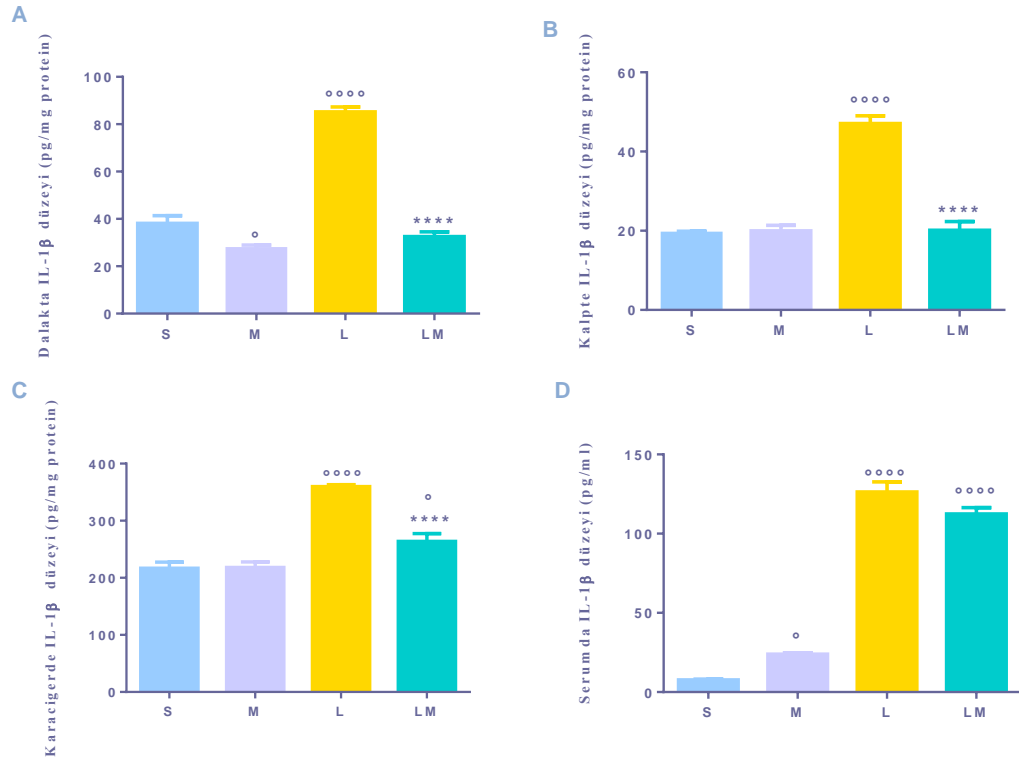
LPS uygulanmış sıçanlarda atriyumun isoproterenol ile indüklenen kasılma yanıtı sağlıklı sıçanlara göre anlamlı derecede daha yüksek bulundu (A). Melatonin verilen LPS uygulanmış sıçanlarda septik sıçanlara göre anlamlı derecede azalma saptandı. Bu azalmadaki anlamlılık 10^{-8} M isoproterenol uygulandıktan sonra tespit edildi (B). Ayrıca Melatonin uygulanmış sağlıklı sıçanlarda salin uygulanmış sıçanlara göre bir fark görülmedi (B). Tüm gruplar arasında karbakol ile indüklenen gevşeme yanıtında herhangi bir fark görülmedi (C).



Şekil 4.2.2. İzole organ banyosunda papiller kasın isoproterenol (A) ve karbakol (B) izometrik gerim değişikliği yanıtları. İki-yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur ($p=0,0001$). Post hoc Tukey testi kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. *******, $p<0,001$; S'ye göre anlamlı farklılık vardır. **#** $p<0,1$; L'ye göre anlamlı farklılık vardır. Tüm gruplarda $n=6$. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin)

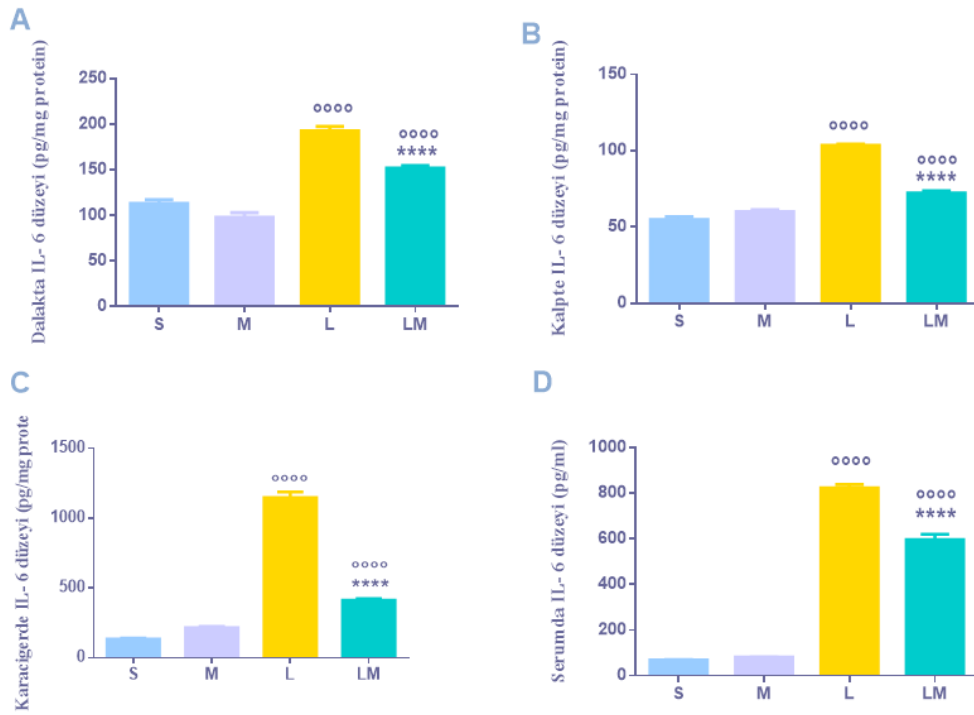
LPS uygulanmış sıçanlarda papiller kasın isoproterenole verdiği yanıt anlamlı derecede değişmese de sonradan melatonin uygulanmış septik sıçanlarda papiller kasın isoproterenole karşı verdiği kasılma yanıtında artma görüldü (A). Melatonin uygulanmış sağlıklı sıçanlarda salin grubuna göre bir fark görülmedi. Papiller kasın karbakol ile indüklenen gevşeme yanıtında gruplar arasında farklılık görülmedi (B).

4.3. ELISA Deneyleri ile Kalp, Dalak, Karaciğer Dokularında ve Serumda IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17, Düzeylerinin Ölçümleri ve TAS, TOS, SOD Değerleri



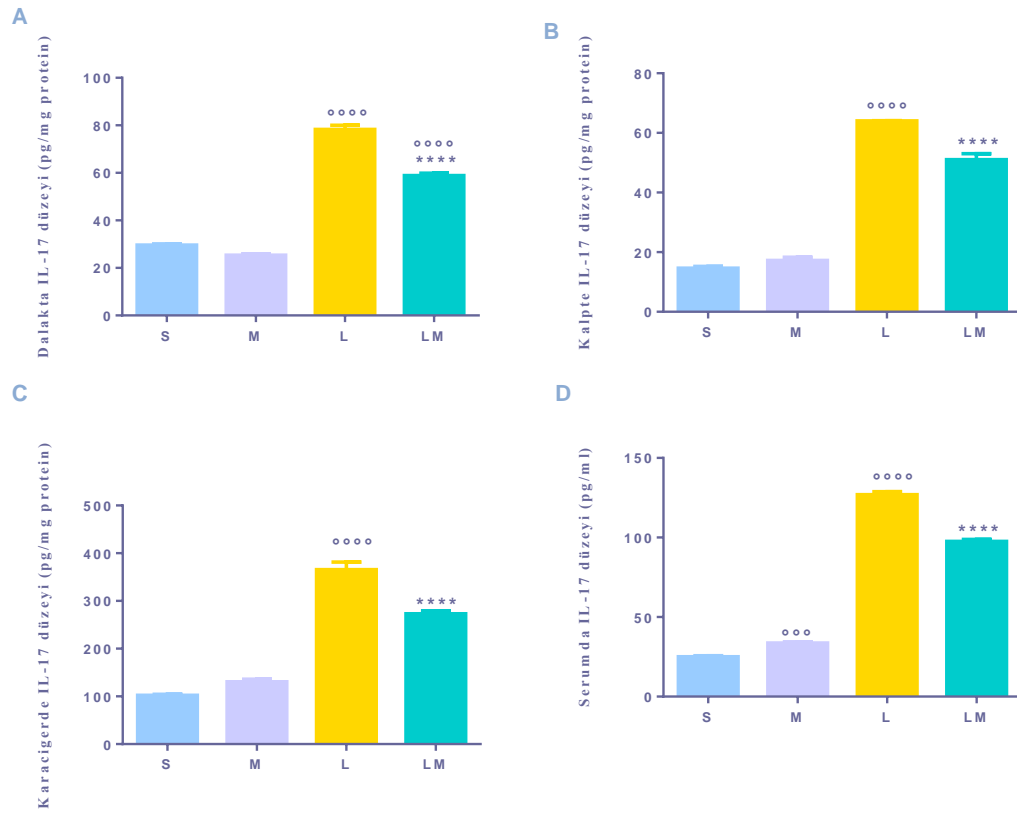
Şekil 4.3.1. Sıçan dalak, kalp, karaciğer ve serum örneklerinde IL-1 β düzeyleri. Tek-yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur ($p=0,0001$). *Post hoc* Bonferroni testi kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. ****, $p<0,0001$; L'ye göre anlamlı farklılık mevcuttur. oooo $p<0,0001$; o $p<0,1$; S'ye göre anlamlı fark mevcuttur. Tüm gruplarda $n=6-8$. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin)

LPS uygulanmış sıçanlarda dalak, kalp, karaciğer ve serumda IL-1 β düzeyi anlamlı derecede arttı (A,B,C,D). Melatonin almış septik sıçanlarda dalak, kalp ve karaciğer dokularında IL-1 β düzeyi anlamlı derecede azalarak sağlıklı sıçanlardaki düzeye geldi (A,B,C). Yalnızca serumdaki IL-1 β düzeyindeki azalma anlamlı bulunmadı (D) . Melatonin uygulanan sağlıklı sıçanlarda IL-1 β düzeyi yalnızca serum örneğinde artmış bulundu (D). Melatonin uygulanan sağlıklı sıçanlardaki IL-1 β düzeyi dalak dokusunda sağlıklı sıçanlara göre daha da düşük bulundu (Şekil 4.3.1., A). Dalak ve kalpte LM ve S grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 4.3.1., A ve B).



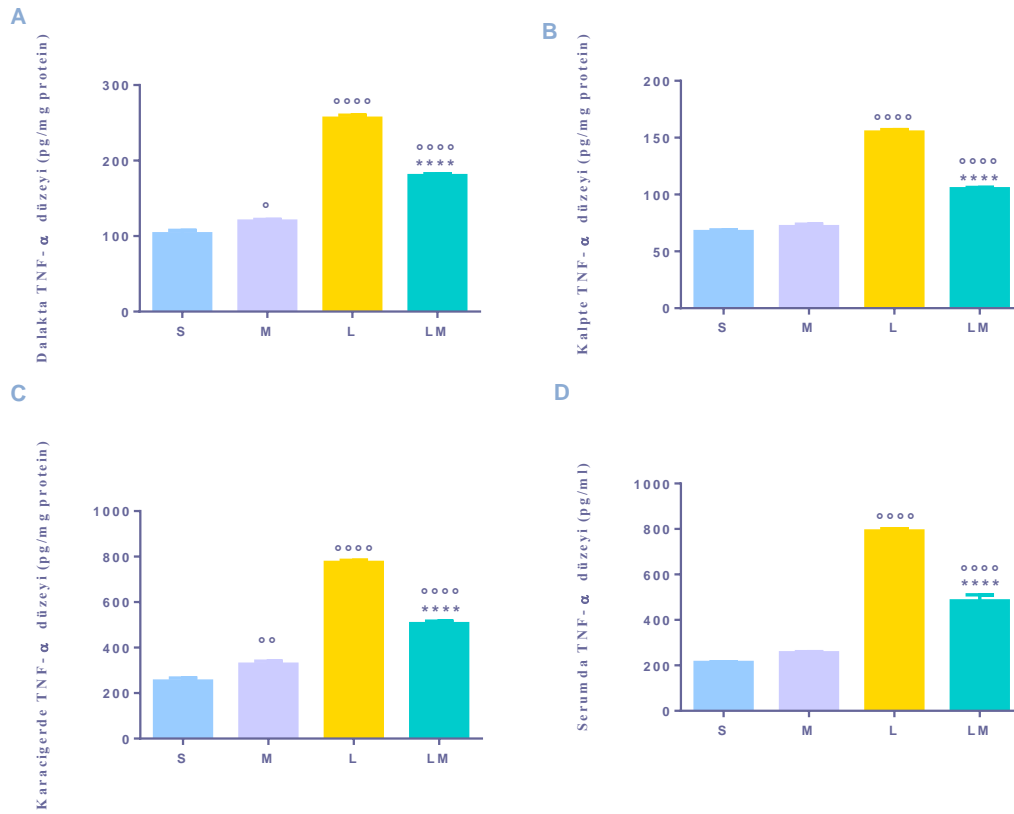
Şekil 4.3.2. Sıçan dalak, kalp, karaciğer ve serum örneklerinde IL-6 düzeyleri. Tek-yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur ($p=0,0001$). *Post hoc* Bonferroni testi kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. ****, $p<0,0001$; L'ye göre anlamlı farklılık mevcuttur. oooo $p<0,0001$; S'ye göre anlamlı fark mevcuttur. Tüm gruplarda $n=6-8$. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin).

LPS uygulanmış sıçanlarda dalak, kalp, karaciğer ve serumda IL-6 düzeyi anlamlı derecede arttı. Melatonin uygulanmış septik sıçanlarda ise tüm dokularda artmış IL-6 düzeyinin anlamlı derecede düştüğü görüldü. Melatonin tek başına uygulandığında dokulardaki IL-6 düzeyine etki etmedi (Şekil 4.3.2.).



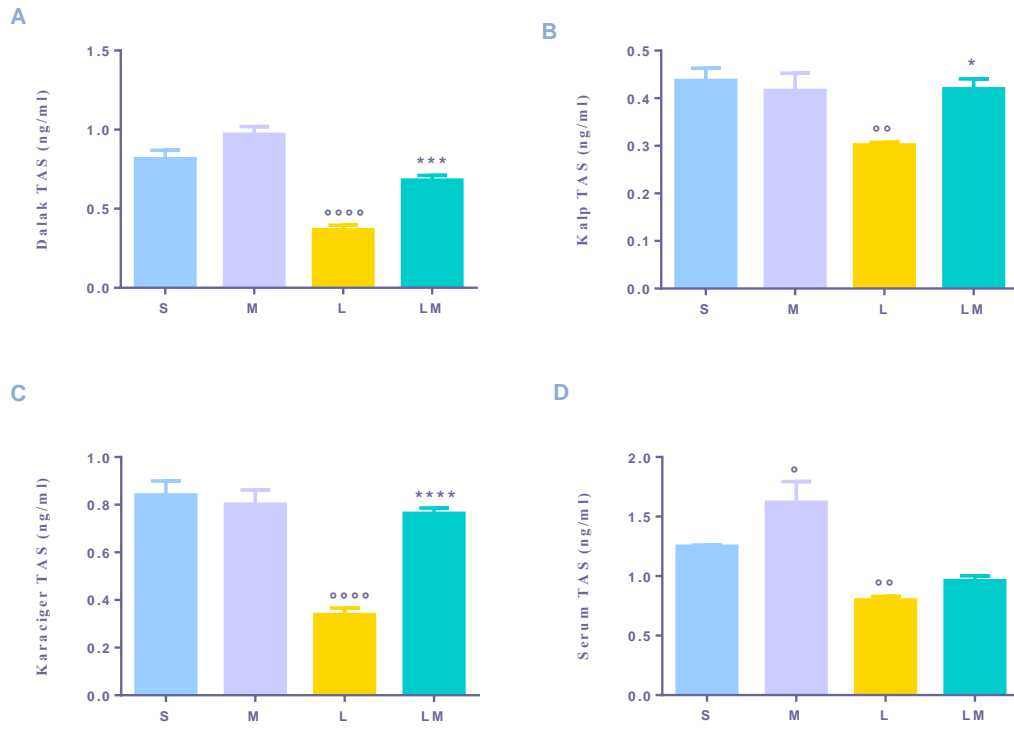
Şekil 4.3.3. Sıçan dalak, kalp, karaciğer ve serum örneklerinde IL-17 düzeyleri. Tek-yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur ($p=0,0001$). *Post hoc* Bonferroni testi kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. ****, $p<0,0001$; L'ye göre anlamlı farklılık mevcuttur. oooo $p<0,0001$; S'ye göre anlamlı fark mevcuttur. Tüm gruplarda $n=6-8$. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin).

LPS uygulanmış sıçanlarda dalak, kalp, karaciğer ve serumda IL-17 düzeyi anlamlı derecede arttı (A,B,C,D). Melatonin septik sıçanlarda tüm dokularda artmış IL-17 düzeyini anlamlı derecede düşürdü (Şekil 4.3.3.).



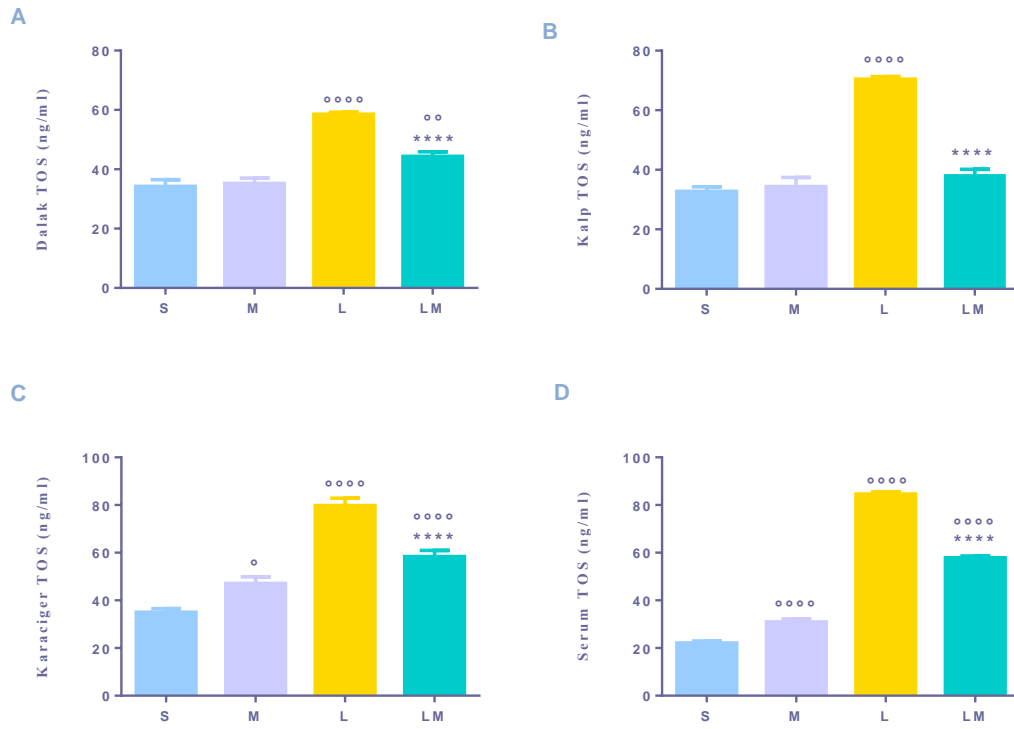
Şekil 4.3.4. Sıçan dalak, kalp, karaciğer ve serum örneklerinde TNF-α düzeyleri. Tek-yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur ($p=0,0001$). *Post hoc* Bonferroni testi kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. ****, $p<0,0001$; L'ye göre anlamlı farklılık mevcuttur. oooo $p<0,0001$; oo $p<0,01$; o $p<0,1$; S'ye göre anlamlı fark mevcuttur. Tüm gruplarda $n=6-8$. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin).

LPS uygulanmış sıçanlarda dalak, kalp, karaciğer ve serumda TNF- α düzeyi anlamlı derecede arttı. Sonradan melatonin almış septik sıçanlarda ise tüm dokularda artmış TNF- α düzeyi azaldı (A,B,C,D). Melatonin uygulanan sağlıklı sıçanlarda TNF- α düzeyi kalp ve serum örneklerinde değişmemiş olup (B,D); dalak ve karaciğer dokusunda salin grubuna göre hafif artışa neden oldu (Şekil 4.3.4., A ve C).



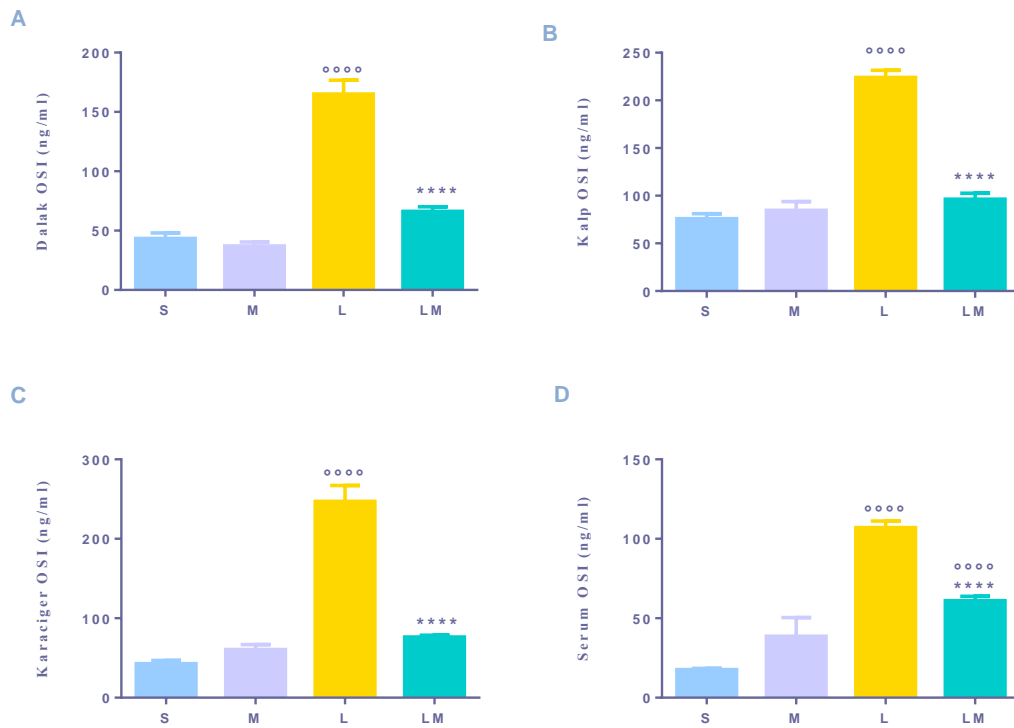
Şekil 4.3.5. Sıçan dalak, kalp, karaciğer ve serum örneklerinde TAS düzeyleri. Tek-yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur ($p=0,0001$). *Post hoc* Bonferroni testi kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. ****, $p<0,0001$; ***, $p<0,001$; *, $p<0,1$; L'ye göre anlamlı farklılık mevcuttur. oooo $p<0,0001$; oo $p<0,01$; o $p<0,1$; S'ye göre anlamlı fark mevcuttur. Tüm gruplarda $n=6-8$. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin).

LPS uygulanmış sıçanlarda dalak, kalp, karaciğer ve serumda TAS düzeyi salin grubuna göre anlamlı derecede azaldı (A,B,C,D). Melatonin uygulanan septik sıçanlarda dalak, kalp ve karaciğer dokularında TAS düzeyi LPS uygulanmış gruplara göre anlamlı derecede artarak sağlıklı sıçanlar ile aynı seviyeye geldi (A,B,C). Yalnızca serumdaki TAS düzeyindeki artış anlamlı bulunmadı (D). Melatoninin tek başına uygulandığı sıçanlardan alınan serum örneklerinde TAS düzeyi salin grubuna göre anlamlı ölçüde arttı (Şekil 4.3.5., D). Kalp, karaciğer, dalak ve serumda S ve LM grupları arasında anlamlı fark saptanmadı (Şekil 4.3.5., A, B, C, D).



Şekil 4.3.6. Sıçan dalak, kalp, karaciğer ve serum örneklerinde TOS düzeyleri. Tek-yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur ($p=0,0001$). *Post hoc* Bonferroni testi kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. ****, $p<0,0001$; L'ye göre anlamlı farklılık mevcuttur. oooo $p<0,0001$; o $p<0,1$; S'ye göre anlamlı fark mevcuttur. Tüm gruplarda $n=6-8$. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin).

LPS uygulanmış sıçanlarda dalak, kalp, karaciğer ve serumda TOS düzeyi salin grubuna göre anlamlı derecede arttı. Melatonin uygulanmış septik sıçanlarda dalak, kalp ve karaciğer dokularında ve serumda TOS düzeyi LPS grubuna göre anlamlı derecede azalarak sağlıklı sıçanlardaki düzeye geldi. Melatoninin tek başına uygulandığı sıçanlardan alınan karaciğer dokusu ve serum örneklerinde TOS düzeyi salin grubuna göre anlamlı derecede arttı (Şekil 4.3.6., C ve D). Kalpte LM ve S grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 4.3.6., B).



Şekil 4.3.7. Sıçan dalak, kalp, karaciğer ve serum örneklerinde OSI düzeyleri. Tek-yönlü ANOVA testine göre gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur ($p=0,0001$). *Post hoc* Bonferroni testi kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. ****, $p<0,0001$; L'ye göre anlamlı farklılık mevcuttur. oooo $p<0,0001$; o $p<0,1$; S'ye göre anlamlı fark mevcuttur. Tüm gruplarda $n=6-8$. (S= Salin, L= LPS, M= Melatonin, LM= LPS+melatonin).

LPS uygulanmış sıçanlarda dalak, kalp, karaciğer ve serumda OSI değeri salin grubuna göre anlamlı derecede arttı. Melatonin uygulanmış septik sıçanlarda ise; tüm dokulardaki OSI değerinin LPS grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığı saptandı. Melatonin tek başına uygulandığında OSI değerine bir etkisi olmadı. Dalak, kalp ve karaciğerde LM ve S grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 4.3.7.).

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında sepsiste gözlenen kardiyak disfonksiyonda melatoninin olası düzeltici etkisi incelendi. Sıçan kalp kardiyak fonksiyonu Langendorff deney düzeneğinde 30 dakika perfüzyon süresince takip edildi. Perfüzyon sistemi içinde kalp fonksiyonlarının incelenmesi bazı refleks mekanizmalar başta olmak üzere, *in vivo* şartlarda ortadan kaldırılamayan çok çeşitli sekonder faktörü ortadan kaldırarak ilacın kalp üzerindeki mutlak, direkt etkilerini incelemek için imkân sağlamaktadır. Bu çalışmada 4 mg/kg i.p. LPS verilen septik sıçanlardan alınan kalplerde, kalp atım hızı hariç diğer tüm fonksiyonel parametrelerin bazal değerlerinde anlamlı değişiklik meydana geldiği gözlemlendi. Bazal değerler üzerinden incelendiğinde septik kalplerde LVDP, koroner akım hızı, dP/dt_{max} ve dP/dt_{min} değerlerinin anlamlı derecede arttığı görüldü. Bu durum LPS'nin kalp üzerindeki etkisinin bir göstergesidir. İzole organ banyosunda atriyum kasılması, tüm sitokin düzeylerinde artış, oksidan kapasitenin artması ve antioksidan kapasite de azalma ile fonksiyonel ve moleküler düzeyde LPS uygulanan septik sıçanlarda değişiklik saptandı. Farklılık saptanmayan atriyum gevşeme ve papiller kas fonksiyonları ve kalp atım hızı konusunda literatürde de çelişkili bilgiler mevcuttur.

Bu tez çalışmasında melatonin dozu öncelikle laboratuvarımızda daha önce yürütülmüş çalışmalar göz önünde bulundurularak seçilmiştir. Baykal A. ve ark., 1, 10, 100 ve 500 mg/kg dozlarında melatoninin LPS ile oluşturulan sıçan sepsis modelinde TNF- α artışını düşürdüğünü ve bu etkinin düşük dozlarda (1 ve 10 mg/kg) daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda melatoninin sağlıklı hayvanlara uygulandığında 100 ve 500 mg/kg dozlarda mezenterik kan akımını azalttığını fakat bu etkinin LPS varlığında görülmediğini saptamışlardır. Melatoninin etkilerinin doz bağımlı olduğunu ve faydalı etkilerinin daha yüksek dozlarda ters yönde ve hatta zararlı olabileceğini tartışmışlardır (149). Zhang ve ark. 30 mg/kg melatoninin ejeksiyon fraksiyonunda artışa neden olduğu kalbin sistolik fonksiyonunu iyileştirdiğini göstermiştir (205). Bu çalışmada uygulanan melatonin dozu farmakolojik aralıktadır, septik sıçan ve fare modellerinde düzeltici etkileri gösterilmiştir (149, 205).

Melatonin, septik kalpte takip edilen bazı parametrelerde olumlu, düzeltici etkiler gösterdi. Sağlıklı sıçanlarda, perfüzyon süresi arttıkça sol ventrikülün geliştirdiği basınç (LVDP) bazale göre değişmezken; LPS uygulanmış sıçanlarda bu basıncın zamanla anlamlı derecede değişkenlik gösterdiği ve söz konusu göstergenin LPS grubunda salin grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptandı. Melatonin uygulanmış septik sıçan grubunda bazale göre yüzde değişim oranının, sepsis grubuna göre daha az olduğu gösterildi. Aynı şekilde septik sıçan kalplerinde koroner akım hızının bazale göre değişimi 10. dakikadan itibaren anlamlı derecede azaldı. Sağlıklı sıçanlarda koroner akım hızının bazale göre değişiminin perfüzyon süresince stabil kaldığı gözlemlendi. Melatonin uygulanmış septik sıçan grubunda ise veriler grafiğe aktarıldığında sağlıklı sıçanlardakine yakın bir eğri trendi izledi. Benzer durum kalp atım hızı için de geçerlidir. Septik sıçan kalplerinde kalp atım hızının bazale göre oranı perfüzyon süresince azaldı. Melatonin uygulanmış septik sıçan kalplerinde tespit edilen kalp atım hızı değişim oranı sağlıklı sıçan kalplerindeki benzer trend izledi. Bu bulgulardan hareketle melatoninin perfüzyon süresince artan LVDP, azalan kalp atım hızı ve koroner akım hızını septik hayvanlara göre düzelttiği öne sürülebilir.

Kalbin kasılma ve gevşeme kapasitesini gösteren sol ventrikül basınç zaman eğrisinin zamana göre türevinin maksimum değerinin ve minimum değerinin septik koşullarda azaldığı gösterildi. Melatonin septik sıçanlarda gözlenen bu kalp kasılma ve gevşeme bozukluğu üzerine etki etmedi. Melatoninin sol ventrikül basıncındaki düşüşü ve koroner akım hızındaki azalmayı düzeltirken kalp kası fonksiyonlarına etkisiz olması, kalp dokusunun kanlanması bozulmadığı için, LPS'nin direkt kalp kası üzerine etkisini düşündürmektedir.

İzole organ banyosu deneylerinde atriyum ve papiller kasın isoproterenol ve karbakol ile oluşturulan kasılma ve gevşeme yanıtları incelendi. İzole organ banyosu deneylerinde LPS uygulanmış sıçanlarda sadece atriyumun isoproterenole verdiği yanıtın arttığı gözlemlendi. Septik sıçanlara melatonin uygulandığında septik sıçanlardaki izole atriyum artmış kasılma yanıtının azalmasının belirli bir isoproterenol konsantrasyonundan (10^{-8} M) sonra anlamlı olduğu saptandı. Papiller kasın isoproterenole yanıtında bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu çalışmada 4 mg/kg LPS

enjeksiyonundan 4 saat sonra yapılan Langendorff deneylerinde tespit edilen kalp kası kasılma-gevşeme fonksiyonundaki bozulmalar, yine aynı süre sonra yapılan izole organ banyosu deneylerinde gözlenmedi. Atriyum ve papiller kas preparatlarında karbakole yanıtlarında septik ve normal sıçanlar arasında fark gözlenmedi.

Melatoninin moleküler düzeyde antioksidan özellikleri literatürde birçok çalışmada gösterilmiştir (39, 56, 90, 107, 122). Bu çalışmada LPS uygulanmış sıçanlardan alınan kalp, dalak, karaciğer, serum örneklerinde antioksidan kapasiteyi gösteren TAS seviyelerinin sağlıklı sıçanlara göre oldukça düşük olduğu gösterildi. Melatonin uygulanmış septik sıçanlardan alınan kalp, dalak, karaciğer, serum örneklerindeki ölçümlerde ise septik sıçanlardaki değerlere göre anlamlı derecede daha yüksek TAS düzeyi tespit edildi. Ayrıca artan TOS seviyeleri ve bozulan OSI değerleri de normale döndü. Melatonin kalp başta olmak üzere LPS varlığında antioksidan ve oksidan kapasite bozulmasının önüne geçti. Bu çalışmada literatürü destekleyecek şekilde melatoninin antioksidan etkileri kalp, karaciğer, dalak dokuları ve serumda gösterildi.

ELISA ile çeşitli sitokin düzeylerinin ölçüldüğü deneylerde; LPS uygulanmış sıçanlardan alınan kalp, dalak, karaciğer, serum örneklerinde IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α değerlerinin sağlıklı sıçanlardaki ölçümlere göre anlamlı derecede arttığı görüldü. Melatonin uygulanmış septik sıçanlardan alınan kalp, dalak, karaciğer, serum örneklerindeki ölçümlerde ise septik sıçanlardaki değerlere göre anlamlı derecede daha az sitokin düzeyi saptandı (Serum IL-1 β haricinde). Septik şokun başlatılmasında majör rol oynayan proinflamatuvarlar IL-1 β ve TNF- α seviyelerinin melatonin uygulanmış tüm septik sıçan doku örneklerinde, septik sıçanlara göre anlamlı derecede azalma kaydedilmesi önemlidir. Bu azalma kalp dokusunda da anlamlı olduğu tespit edildi. Melatonin dalak ve kalp dokusunda LPS varlığında indüklenen IL-1 β artışını engelledi. Yine sepsisin majör regülatuvar sitokinlerinden IL-6 düzeyinin melatonin uygulanmış septik sıçanlarda sağlıklı sıçanlardaki düzeye yaklaştığı gözlemlendi. IL-17 sepsiste arttığı tespit edilen proinflamatuvar sitokinlerden biri olmasının yanı sıra, endotoksemik kalpte gelişen “ventriküler remodelling” ile ilişkilendirilmiştir. Bazı çalışmalarda ise infarkt sonrası kalp dokusunda düzeyinin

arttığı gösterilmiştir (137). Literatürde melatoninin sepsiste artan IL-17 düzeyi üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmamızda literatürde ilk defa LPS ile indüklenerek artmış IL-17 düzeyinin kalp, dalak, karaciğer ve serumda melatonin uygulanmış sepsis sıçanlarda azaldığı gösterildi. Bu tez çalışmasında melatoninin sepsiste görülen sitokin fırtınasına yönelik düzeltici etkisi kalp dokusu başta olmak üzere incelenen tüm dokularda gösterildi.

Miyokart disfonksiyonu sepsis ve sepsis şokta bir hastanın hayatta kalıp kalmayacağını belirleyen önemli bir faktördür (2,7). Hayatta kalanlarda yeterli kalp atım hacminin korunmasına yardımcı olan daha yüksek bir diyastol sonu hacmi ile ventriküler uyum artırılır. Ölen hastalarda ise kalp bunun aksine diyastolik uyum azaldığı için atım hacmini koruyamaz. Melatonin moleküler düzeyde sepsisin inflamatuvar ve oksidatif etkilerini tersine çevirdiğini bu çalışmada gösterse de fonksiyonel düzeyde majör bir etki göstermedi. Bu çalışma bulguları miyokart disfonksiyonunda oksidatif hasarın ve sitokin fırtınasının temel sorumlu olmadığını göstermektedir.

Bu tez çalışmasının bazı kısıtlamaları ve eksiklikleri de vardır. Langendorff deneylerinde LPS'nin kalbin fonksiyonuna yönelik negatif etkisi dP/dt_{max} ve dP/dt_{min} 30. dk değerlerinde gösterildi ve melatonin bu etkiyi düzeltmedi (Şekil 4.1.4). Melatonin uygulanmış sıçanlarda 30. dk'daki bu negatif etkilerde düzelme görülmesi dP/dt_{min} değerlerinin 10., 20. ve 30. dk'da bazale göre değişimi incelendiğinde, melatonin LPS ile indüklenen gevşeme fonksiyonundaki bozulmayı anlamlı derecede düzeltti (Şekil 4.1.6.). Bu çalışmada deney düzeneğimiz ve protokolümüze göre kalp perfüzyonu için 60 dk kalibrasyon süresi ve 30 dk ölçüm süresi belirlendi. Bu değişim oranlarındaki farklılık, daha uzun süreli izole kalp perfüzyonu protokollerinde, melatonin uygulanmış sepsis sıçanlarda sepsis sıçanlara göre farkın daha belirgin derecede tespit edilebileceğini düşündürmektedir. Melatoninin dozu ve veriliş zamanı da bu negatif sonuçta bir faktör olarak göz önünde bulundurulmalıdır.

Zhang ve ark. (156) 30 mg/kg melatoninin kalbin sistolik fonksiyonuna destekleyici etkileri olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada da LPS'den 2 saat sonra 30 mg/kg melatonin uygulanan grupta, koroner akım hızını, sol ventrikül gelişen

basınç, kalp atım hızı parametrelerinin bazale göre değişim oranlarını sağlıklı sıçanlarda tespit edilen eğrilere benzer veya yakın bir trend izleyecek şekilde olduğu görüldü. Bununla birlikte daha iyi bir değerlendirme için daha uzun süreli perfüzyon ile planlanan farklı protokollere ihtiyaç olduğu da görülmektedir.

Sonuç olarak; bu tez çalışmasında 4 mg/kg dozda LPS ile oluşturulan kardiyak disfonksiyon Langendorff deney modelinde gösterildi. Langendorff perfüze kalp düzeneğinde gösterilen bu disfonksiyonun izole organ banyosunda incelenen parametrelere yansımadağı görüldü. Biyokimyasal parametrelerde LPS incelenen sitokin seviyelerini ve oksidan kapasiteyi artırdı, antioksidan kapasiteyi azalttı. Hem fonksiyonel hem de biyokimyasal düzeyde LPS ile sepsiste görülen değişiklikler tespit edilerek amaca ulaşıldı. Bu çalışma melatoninin kardiyak fonksiyona etkisinin, hem Langendorff kalp perfüzyonu hem de izole organ banyosu kullanılarak birlikte değerlendirildiği literatürde bilinen ilk çalışmadır. 30 mg/kg melatonin uygulanan septik sıçanlarda, kalp fonksiyonu ile ilişkilendirilen güncel bir sitokin olan IL-17 düzeyinin artışının engellendiği literatürde ilk defa bu çalışmada gösterildi.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Melatonin, deneysel sepsis modelinde gözlenen kardiyak disfonksiyonda bozulan sol ventrikülün geliştirdiği basınç (LVDP), kalp atım hızı ve koroner akım hızını düzeltti.
2. Melatonin deneysel sepsis modelinde LPS sonrası gözlenen kalp kası kasılma ve gevşeme bozukluğunu düzeltmedi.
3. Melatonin kardiyak disfonksiyona ek olarak bu çalışmada gözlenen atriyumun isoproterenole verdiği yanıt artışını önledi.
4. Melatonin başta kalp olmak üzere karaciğer, dalak ve serumda antioksidan etki gösterdi.
5. Melatoninin sepsiste görülen sitokin fırtınasına yönelik düzeltici etkisi özellikle kalp başta olmak üzere karaciğer, dalak ve serumda gözlendi.
6. Bu çalışma bulguları sepsiste miyokart disfonksiyonunda oksidatif hasarın ve sitokin fırtınasının temel sorumlu olmadığını göstermektedir.
7. Literatürde ciddi bir yan etkisine rastlanmayan melatonin bu çalışmada kalp kası fonksiyon bozukluğunu düzeltmemesine rağmen kalp dâhil birçok organ ve sistemde pozitif yararlar sağladı.
8. Bu sonuçlar septik hayvanlara melatonin uygulamasının zamana ve faza bağlı olabileceğini göstermektedir. Farklı doz melatonin ve farklı deney protokolleri ile çalışmalar devam ettirilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Geroulanos S, Douka ET. Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med.* 2006;32(12):2077.
2. Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin.* 2009;25(1):83-101, viii.
3. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992;20(6):864-74.
4. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1250-6.
5. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801-10.
6. WHAT IS SEPSIS? - DEFINITION OF SEPSIS [Available from: <https://www.global-sepsis-alliance.org/sepsis/>].
7. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):775-87.
8. Parrillo JE. The cardiovascular pathophysiology of sepsis. *Annu Rev Med.* 1989;40:469-85.
9. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2001;345(19):1368-77.
10. Antonucci E, Fiaccadori E, Donadello K, Taccone FS, Franchi F, Scolletta S. Myocardial depression in sepsis: from pathogenesis to clinical manifestations and treatment. *J Crit Care.* 2014;29(4):500-11.
11. Flynn A, Chokkalingam Mani B, Mather PJ. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. *Heart Fail Rev.* 2010;15(6):605-11.
12. Hunter JD, Doddi M. Sepsis and the heart. *Br J Anaesth.* 2010;104(1):3-11.
13. Stein B, Frank P, Schmitz W, Scholz H, Thoenes M. Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28(8):1631-9.
14. Pathan N, Hemingway CA, Alizadeh AA, Stephens AC, Boldrick JC, Oragui EE, et al. Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. *Lancet.* 2004;363(9404):203-9.

15. Celes MR, Prado CM, Rossi MA. Sepsis: going to the heart of the matter. *Pathobiology*. 2013;80(2):70-86.
16. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet*. 2005;365(9453):63-78.
17. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med*. 1990;113(3):227-42.
18. Vieillard-Baron A, Caille V, Charron C, Belliard G, Page B, Jardin F. Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock. *Crit Care Med*. 2008;36(6):1701-6.
19. Lokhorst G-J. Descartes and the Pineal Gland. Winter 2018 ed. Zalta EN, editor: *The Metaphysics Research Lab* 2018.
20. Allen CPMFP. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *Journal of Experimental Zoology*
Article. 1917;23(1):207-24.
21. Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int*. 1994;24(2):101-46.
22. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. ISOLATION OF MELATONIN, THE PINEAL GLAND FACTOR THAT LIGHTENS MELANOCYTES¹. *Journal of the American Chemical Society*. 1958;80(10):2587-.
23. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*. 2006;273(13):2813-38.
24. Paredes SD, Bejarano I, Terron MP, Barriga C, Reiter RJ, Rodriguez AB. Melatonin and tryptophan counteract lipid peroxidation and modulate superoxide dismutase activity in ringdove heterophils in vivo. Effect of antigen-induced activation and age. *Age (Dordr)*. 2009;31(3):179-88.
25. Utiger RD. Melatonin--the hormone of darkness. *N Engl J Med*. 1992;327(19):1377-9.
26. Tijmes M, Pedraza R, Valladares L. Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids*. 1996;61(2):65-8.
27. Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. Pineal melatonin, its fundamental immunoregulatory role in aging and cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;521:140-8.
28. Maestroni GJ, Conti A. The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4⁺, Thy-1⁺ cells to release opioid agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties. *J Neuroimmunol*. 1990;28(2):167-76.

29. Lissoni P, Paolorossi F, Tancini G, Barni S, Ardizzoia A, Brivio F, et al. Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia? *Eur J Cancer*. 1996;32A(8):1340-3.
30. Martins Jr E, Fernandes LC, Bartol I, Cipolla-Neto J, Costa Rosa LFBP. The effect of melatonin chronic treatment upon macrophage and lymphocyte metabolism and function in Walker-256 tumour-bearing rats. *Journal of Neuroimmunology*. 1998;82(1):81-9.
31. Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci*. 2002;47(10):2336-48.
32. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*. 1991;12(2):151-80.
33. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev*. 1998;78(3):687-721.
34. Maestroni GJ. The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. *J Photochem Photobiol B*. 1998;43(3):186-92.
35. Ting KN, Blaylock NA, Sugden D, Delagrange P, Scalbert E, Wilson VG. Molecular and pharmacological evidence for MT1 melatonin receptor subtype in the tail artery of juvenile Wistar rats. *Br J Pharmacol*. 1999;127(4):987-95.
36. Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT, Holowachuk EW, Ruhoff MS, Kopff HS. Melatonin inhibition of cancer growth in vivo involves suppression of tumor fatty acid metabolism via melatonin receptor-mediated signal transduction events. *Cancer Res*. 1999;59(18):4693-701.
37. Cajochen C, Krauchi K, Wirz-Justice A. Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. *J Neuroendocrinol*. 2003;15(4):432-7.
38. Hardeland R, Balzer I Fau - Poeggeler B, Poeggeler B Fau - Fuhrberg B, Fuhrberg B Fau - Uria H, Uria H Fau - Behrmann G, Behrmann G Fau - Wolf R, et al. On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. (0742-3098 (Print)).
39. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*. 2002;2(2):181-97.
40. Reiter RJ, Tan DX, Allegra M. Melatonin: reducing molecular pathology and dysfunction due to free radicals and associated reactants. *Neuro Endocrinol Lett*. 2002;23 Suppl 1:3-8.
41. Yen-Mei Lee HRC, George Hsiao, Joen-Rong, Sheu, Jhi-Joung Wang, Mao-Hsiung Yen. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo. *Journal of Pineal Research*. 2002;33(2):72-80.
42. de Talamoni N.T. AVA, Lopez M.E.P., de Barboza G.D., Rivoira M.A., Carpentieri A.R. Past, Present, and Future of Melatonin's Clinical Uses. *Melatonin and Melatonergic Drugs in Clinical Practice: Springer; 2014*.

43. Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J Pineal Res.* 1993;14(4):151-68.
44. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res.* 2007;42(1):28-42.
45. Axelrod J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science.* 1974;184(4144):1341-8.
46. Skene DJ, Arendt J. Human circadian rhythms: physiological and therapeutic relevance of light and melatonin. *Ann Clin Biochem.* 2006;43(Pt 5):344-53.
47. Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrangé P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26(8):412-9.
48. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev.* 2005;9(1):11-24.
49. Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P, Malpoux B. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology.* 2002;143(1):84-90.
50. Srinivasan V, Zakaria R, Othaman Z, Brzezinski A, Prasad A, Brown GM. Melatonergic drugs for therapeutic use in insomnia and sleep disturbances of mood disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2012;11(2):180-9.
51. Tricoire H, Moller M, Chemineau P, Malpoux B. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reprod Suppl.* 2003;61:311-21.
52. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol.* 2004;25(3-4):177-95.
53. Griefahn B, Brode P, Blaszkewicz M, Remer T. Melatonin production during childhood and adolescence: a longitudinal study on the excretion of urinary 6-hydroxymelatonin sulfate. *J Pineal Res.* 2003;34(1):26-31.
54. Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem.* 1974;249(4):1311-3.
55. Hardeland R. Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *Biofactors.* 2009;35(2):183-92.
56. Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res.* 2003;34(1):75-8.
57. Besseau L, Benyassi A, Moller M, Coon SL, Weller JL, Boeuf G, et al. Melatonin pathway: breaking the 'high-at-night' rule in trout retina. *Exp Eye Res.* 2006;82(4):620-7.
58. Kalsbeek A, Perreau-Lenz S, Buijs RM. A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiol Int.* 2006;23(3):521-35.

59. Larsen PJ. Tracing autonomic innervation of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Microsc Res Tech*. 1999;46(4-5):296-304.
60. Borjigin J, Li X, Snyder SH. The pineal gland and melatonin: molecular and pharmacologic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:53-65.
61. Moore RY. Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annu Rev Med*. 1997;48:253-66.
62. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 2002;295(5557):1070-3.
63. Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM, Byrne B, Glickman G, Gerner E, et al. Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *J Neurosci*. 2001;21(16):6405-12.
64. Reiter RJ. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*. 1991;79(1-3):C153-8.
65. Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Garidou ML, Wortel J, van der Vliet J, van Heijningen C, et al. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci*. 2003;17(2):221-8.
66. Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, Van Der Vliet J, Simonneaux V, Pevet P, et al. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci*. 2000;12(9):3146-54.
67. Huang Z, Liu T, Chatteraj A, Ahmed S, Wang MM, Deng J, et al. Posttranslational regulation of TPH1 is responsible for the nightly surge of 5-HT output in the rat pineal gland. *J Pineal Res*. 2008;45(4):506-14.
68. Liu T, Borjigin J. Relationship between nocturnal serotonin surge and melatonin onset in rodent pineal gland. *J Circadian Rhythms*. 2006;4:12.
69. Sun X, Deng J, Liu T, Borjigin J. Circadian 5-HT production regulated by adrenergic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(7):4686-91.
70. Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology*. 1972;91(5):1213-8.
71. Cardinali DP, Pevet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev*. 1998;2(3):175-90.
72. Vosko A, Colwell C, Avidan A, Alon C, Avidan A. Jet lag syndrome: Circadian organization, pathophysiology, and management strategies 2010. 2-187 p.
73. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev*. 2010;62(3):343-80.
74. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*. 2005;27(2):101-10.

75. Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(13):6133-7.
76. Kokkola T, Laitinen JT. Melatonin receptor genes. *Ann Med*. 1998;30(1):88-94.
77. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*. 2000;275(40):31311-7.
78. Daulat AM, Maurice P, Froment C, Guillaume JL, Broussard C, Monsarrat B, et al. Purification and identification of G protein-coupled receptor protein complexes under native conditions. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6(5):835-44.
79. Benitez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res*. 2006;40(1):1-9.
80. Wiesenberg I, Missbach M, Carlberg C. The potential role of the transcription factor RZR/ROR as a mediator of nuclear melatonin signaling. *Restor Neurol Neurosci*. 1998;12(2-3):143-50.
81. Slominski A, Fischer TW, Zmijewski MA, Wortsman J, Semak I, Zbytek B, et al. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine*. 2005;27(2):137-48.
82. Roberts JE, Hu DN, Martinez L, Chignell CF. Photophysical studies on melatonin and its receptor agonists. *J Pineal Res*. 2000;29(2):94-9.
83. Silva SO, Rodrigues MR, Ximenes VF, Bueno-da-Silva AE, Amarante-Mendes GP, Campa A. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. *J Neuroimmunol*. 2004;156(1-2):146-52.
84. Carlson LL, Weaver DR, Reppert SM. Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinology*. 1989;125(5):2670-6.
85. Stehle J, Vanecek J, Vollrath L. Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study. *J Neural Transm*. 1989;78(2):173-7.
86. Vanecek J, Klein DC. Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular Ca²⁺ in neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology*. 1992;130(2):701-7.
87. McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU. Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology*. 1997;138(2):627-34.
88. Vanecek J, Kosar E, Vorlicek J. Daily changes in melatonin binding sites and the effect of castration. *Mol Cell Endocrinol*. 1990;73(2-3):165-70.
89. Carlberg C. Gene regulation by melatonin. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;917:387-96.

90. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004;36(1):1-9.
91. von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 2002;309(1):151-62.
92. Ekmekcioglu C, Thalhammer T, Humpeler S, Mehrabi MR, Glogar HD, Holzenbein T, et al. The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. *J Pineal Res.* 2003;35(1):40-4.
93. Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar HD, Grimm M, et al. Expression of the MT1 melatonin receptor subtype in human coronary arteries. *J Recept Signal Transduct Res.* 2001;21(1):85-91.
94. Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar HD, Grimm M, et al. 24h variation in the expression of the mt1 melatonin receptor subtype in coronary arteries derived from patients with coronary heart disease. *Chronobiol Int.* 2001;18(6):973-85.
95. Masana MI, Doolen S, Ersahin C, Al-Ghoul WM, Duckles SP, Dubocovich ML, et al. MT(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302(3):1295-302.
96. Ersahin C, Masana MI, Dubocovich ML. Constitutively active melatonin MT(1) receptors in male rat caudal arteries. *Eur J Pharmacol.* 2002;439(1-3):171-2.
97. Mei YA, Lee PP, Wei H, Zhang ZH, Pang SF. Melatonin and its analogs potentiate the nifedipine-sensitive high-voltage-activated calcium current in the chick embryonic heart cells. *J Pineal Res.* 2001;30(1):13-21.
98. Viswanathan M, Laitinen JT, Saavedra JM. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(16):6200-3.
99. van den Heuvel CJ, Kennaway DJ, Dawson D. Thermoregulatory and soporific effects of very low dose melatonin injection. *Am J Physiol.* 1999;276(2):E249-54.
100. Krauchi K, Cajochen C, Mori D, Graw P, Wirz-Justice A. Early evening melatonin and S-20098 advance circadian phase and nocturnal regulation of core body temperature. *Am J Physiol.* 1997;272(4 Pt 2):R1178-88.
101. Arangino S, Cagnacci A, Angiolucci M, Vacca AM, Longu G, Volpe A, et al. Effects of melatonin on vascular reactivity, catecholamine levels, and blood pressure in healthy men. *Am J Cardiol.* 1999;83(9):1417-9.
102. Cagnacci A, Arangino S, Renzi A, Paoletti AM, Melis GB, Cagnacci P, et al. Influence of melatonin administration on glucose tolerance and insulin sensitivity of postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001;54(3):339-46.
103. Cavallo A, Daniels SR, Dolan LM, Bean JA, Khoury JC. Blood pressure-lowering effect of melatonin in type 1 diabetes. *J Pineal Res.* 2004;36(4):262-6.

104. Scheer FA, Van Montfrans GA, van Someren EJ, Mairuhu G, Buijs RM. Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension. *Hypertension*. 2004;43(2):192-7.
105. Grossman E, Laudon M, Yalcin R, Zengil H, Peleg E, Sharabi Y, et al. Melatonin reduces night blood pressure in patients with nocturnal hypertension. *Am J Med*. 2006;119(10):898-902.
106. Wiechmann AF. Regulation of gene expression by melatonin: a microarray survey of the rat retina. *J Pineal Res*. 2002;33(3):178-85.
107. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov SV, Vesnushkin GM, Vinogradova IA. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(5-6):573-89.
108. Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol*. 2005;165(1-2):139-49.
109. Deng WG, Tang ST, Tseng HP, Wu KK. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood*. 2006;108(2):518-24.
110. Jaworek J, Brzozowski T, Konturek SJ. Melatonin as an organoprotector in the stomach and the pancreas. *J Pineal Res*. 2005;38(2):73-83.
111. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia-Maurino S, Reiter RJ, et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J*. 2004;18(3):537-9.
112. Maestroni GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001;10(3):467-76.
113. Vermeulen M, Palermo M, Giordano M. Neonatal pinealectomy impairs murine antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Neuroimmunol*. 1993;43(1-2):97-101.
114. Currier NL, Sun LZ, Miller SC. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity. *J Neuroimmunol*. 2000;104(2):101-8.
115. Yu Q, Miller SC, Osmond DG. Melatonin inhibits apoptosis during early B-cell development in mouse bone marrow. *J Pineal Res*. 2000;29(2):86-93.
116. Lin XJ, Mei GP, Liu J, Li YL, Zuo D, Liu SJ, et al. Therapeutic effects of melatonin on heatstroke-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res*. 2011;50(4):436-44.
117. Chen CF, Wang D, Reiter RJ, Yeh DY. Oral melatonin attenuates lung inflammation and airway hyperreactivity induced by inhalation of aerosolized pancreatic fluid in rats. *J Pineal Res*. 2011;50(1):46-53.

118. Jaworek J, Szklarczyk J, Jaworek AK, Nawrot-Porabka K, Leja-Szpak A, Bonior J, et al. Protective effect of melatonin on acute pancreatitis. *Int J Inflam.* 2012;2012:173675.
119. Lee MY, Kuan YH, Chen HY, Chen TY, Chen ST, Huang CC, et al. Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pineal Res.* 2007;42(3):297-309.
120. Lotufo CM, Yamashita CE, Farsky SH, Markus RP. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. *Eur J Pharmacol.* 2006;534(1-3):258-63.
121. Kim GD, Lee SE, Kim TH, Jin YH, Park YS, Park CS. Melatonin suppresses acrolein-induced IL-8 production in human pulmonary fibroblasts. *J Pineal Res.* 2012;52(3):356-64.
122. Lowes DA, Webster NR, Murphy MP, Galley HF. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *Br J Anaesth.* 2013;110(3):472-80.
123. Tyagi E, Agrawal R, Nath C, Shukla R. Effect of melatonin on neuroinflammation and acetylcholinesterase activity induced by LPS in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 2010;640(1-3):206-10.
124. Xu DX, Wang H, Ning H, Zhao L, Chen YH. Maternally administered melatonin differentially regulates lipopolysaccharide-induced proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in maternal serum, amniotic fluid, fetal liver, and fetal brain. *J Pineal Res.* 2007;43(1):74-9.
125. Yavuz T, Kaya D, Behcet M, Ozturk E, Yavuz O. Effects of melatonin on *Candida* sepsis in an experimental rat model. *Adv Ther.* 2007;24(1):91-100.
126. Wu WS, Chou MT, Chao CM, Chang CK, Lin MT, Chang CP. Melatonin reduces acute lung inflammation, edema, and hemorrhage in heatstroke rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2012;33(6):775-82.
127. Erbas O, Ergenoglu AM, Akdemir A, Yeniel AO, Taskiran D. Comparison of melatonin and oxytocin in the prevention of critical illness polyneuropathy in rats with experimentally induced sepsis. *J Surg Res.* 2013;183(1):313-20.
128. Sayek ABABIEHMOGGHI. Melatonin modulates mesenteric blood flow and TNF α concentrations after lipopolysaccharide challenge. *European Journal of Surgery.* 2003;166(9):722-7.
129. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Guerrero JM, et al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res.* 2005;39(4):400-8.

130. Schlag HR. Cytokines in Severe Sepsis and Septic Shock: Birkhäuser, Basel; 1999.
131. d'Emmanuele di Villa Bianca R, Marzocco S, Di Paola R, Autore G, Pinto A, Cuzzocrea S, et al. Melatonin prevents lipopolysaccharide-induced hyporeactivity in rat. *J Pineal Res.* 2004;36(3):146-54.
132. Shaji AV, Kulkarni SK, Agrewala JN. Regulation of secretion of IL-4 and IgG1 isotype by melatonin-stimulated ovalbumin-specific T cells. *Clin Exp Immunol.* 1998;111(1):181-5.
133. Nosal'ova V, Zeman M, Cerna S, Navarova J, Zakalova M. Protective effect of melatonin in acetic acid induced colitis in rats. *J Pineal Res.* 2007;42(4):364-70.
134. Leja-Szpak A, Jaworek J, Tomaszewska R, Nawrot K, Bonior J, Kot M, et al. Melatonin precursor; L-tryptophan protects the pancreas from development of acute pancreatitis through the central site of action. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55(1 Pt 2):239-54.
135. Escames G, Lopez LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, et al. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res.* 2006;40(1):71-8.
136. Levy MM, Fink Mp Fau - Marshall JC, Marshall Jc Fau - Abraham E, Abraham E Fau - Angus D, Angus D Fau - Cook D, Cook D Fau - Cohen J, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. (0342-4642 (Print)).
137. Zhou SF, Yuan J, Liao MY, Xia N, Tang TT, Li JJ, Jiao J, Dong WY, Nie SF, Zhu ZF, Zhang WC, Lv BJ, Xiao H, Wang Q, Tu X, Liao YH, Shi GP, Cheng X. IL-17A promotes ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Mol Med (Berl).* 2014 Oct; 92(10):1105-16.
138. Tomás-Zapico, C. and Coto-Montes, A. (2005), A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *Journal of Pineal Research*, 39: 99-104.
139. Pieri C, Moroni F, Marra M, Marcheselli F, Recchioni R. Melatonin is an efficient antioxidant. *Arch Gerontol Geriatr.* 1995;20(2):159-165.
140. Longoni B, Salgo MG, Pryor WA, Marchiafava PL. Effects of melatonin on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. *Life Sci.* 1998;62(10):853-859.
141. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:376-386.
142. Reiter RJ, Tan DX. What constitutes a physiological concentration of melatonin?. *J Pineal Res.* 2003;34(1):79-80.
143. Reiter RJ. Melatonin and human reproduction. *Ann Med.* 1998;30(1):103-108.
144. Reiter RJ. Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol.* 1997;38:103-117.

145. Antolín I, Rodríguez C, Saínz RM, et al. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J*. 1996;10(8):882-890.
146. Dziegiel P, Murawska-Ciałowicz E, Jethon Z, et al. Melatonin stimulates the activity of protective antioxidative enzymes in myocardial cells of rats in the course of doxorubicin intoxication. *J Pineal Res*. 2003;35(3):183-187.
147. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology [published correction appears in *Toxicology* 2001 Jun 21;163(2-3):219]. *Toxicology*. 2000;153(1-3):83-104.
148. Seifert CF, Nesser ME, Thompson DF. Dexrazoxane in the prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity [published correction appears in *Ann Pharmacother* 1994 Dec;28(12):1413]. *Ann Pharmacother*. 1994;28(9):1063-1072.
149. Baykal A, Iskit AB, Hamaloglu E, Guc MO, Hascelik G, Sayek I. Melatonin modulates mesenteric blood flow and TNFalpha concentrations after lipopolysaccharide challenge. *Eur J Surg*. 2000;166(9):722-727.
150. Dziegiel P, Murawska-Ciałowicz E, Jethon Z, et al. Melatonin stimulates the activity of protective antioxidative enzymes in myocardial cells of rats in the course of doxorubicin intoxication. *J Pineal Res*. 2003;35(3):183-187.
151. Kiyuna LA, Albuquerque RPE, Chen CH, Mochly-Rosen D, Ferreira JCB. Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: Challenges and opportunities. *Free Radic Biol Med*. 2018;129:155-168.
152. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sánchez N, Rodríguez-Rodríguez A, Guerrero JM. Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci*. 2013;14(4):8638-8683. Published 2013 Apr 22. doi:10.3390/ijms14048638.
153. How do I measure aortic pressure in a Langendorff Heart preparation? 01/04/2019, <https://www.adinstruments.com/>
154. Rat TAS and Rat TOS ELISA Test Principles Manual, OSI Calculation Manual, 01/03/2018, <https://www.relassay.com/>
155. Rat TNF- α , Rat IL-1 β , Rat IL-6 and Rat IL-17 ELISA Test Principles Manual, 01/03/2018, <https://www.elabscience.com/>
156. Zhang H, Liu D, Wang X, et al. Melatonin improved rat cardiac mitochondria and survival rate in septic heart injury. *J Pineal Res*. 2013;55(1):1-6. doi:10.1111/jpi.12033.