

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MELATONİNİN KRONONOSİSEPSİYONDAKİ ETKİLERİ

T 88809

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ECZ. GÜLDEN SOYAK

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. NURETTİN ABACIOĞLU

YARDIMCI TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. İCLAL ÇAKICI

ANKARA, 2000



CANIM AİLEME

Tez çalışmam sırasında benden bilgisini, ilgisini ve desteğini esirgemeyen ve her zaman bana yardımcı olan tez yöneticim Prof. Dr. Sayın Nurettin ABACIOĞLU'na,

Çalışmam sırasında desteğini, ilgisini, anlayışını esirgemeyen yardımcı tez yöneticim Prof. Dr. Sayın İclal ÇAKICI ve Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sayın İlker KANZİK'a,

İlgisi ve desteğiyle çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan Öğr. Gör. Sayın Bahar TUNÇTAN'a,

Gerek deney aşamasında, gerekse yazım aşamasında her zaman yanımda olan arkadaşlarım Araş. Gör. Sayın Bilgen HOŞGÖR-BAŞGUT, Araş. Gör. Sayın Gülizar YILDIZ ve Araş. Gör. Sayın Feyza ADEMOĞLU'na,

Deneylerimde daima yanımda olan Dr. Sayın Şeref HOŞGÖR ve Sayın Hakan HOŞGÖR'e,

Çalışmalarım sırasında ilgi, sabır ve anlayışlarını esirgemeyen annem Gülizar SOYAK, babam Hasan SOYAK ile kardeşlerim Gürkan ve Gülay'a,

Departman içerisinde her zaman bana yardımcı olan tüm mesai arkadaşlarıma içtenliğimle teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
II.1. AĞRI.....	3
II.1.2. AĞRININ PERİFERİK VE SANTRAL MEKANİZMALARI.....	3
II.1.2.1. PERİFERİK AĞRI.....	3
II.1.2.1.1. Ağrı reseptörleri.....	3
II.1.2.1.2. Periferik Ağrı Sinir Lifleri.....	4
II.A.2.1.3. Omurilikte Ağrı İletimi.....	5
II.A.2.2. SANTRAL AĞRI.....	7
II.A.2.2.1 Çıkan Ağrı Yolları.....	8
II..2.2.2. İnen Ağrı Yolları.....	9
II.A.4. DENEY HAYVANLARINDA AĞRI OLUŞTURMA YÖNTEMLERİ	9
II.2. KRONONOBİYOLOJİ VE AĞRI	12
II.2.1. Kronobiyolojik Tanımlar.....	12

II.2.2. Krononosisepsiyon.....	16
II.2. PİNEAL BEZ VE MELATONİN	20
II.2.1. Pineal Bezin Lokalizasyonu ve Fizyolojik Özellikleri.....	20
II.2.2. Melatoninin Kimyasal Yapısı.....	21
II.2.3. Melatonin Biosentezi.....	21
II.2.4. Melatoninin Farmakokinetik Özellikleri.....	24
II.2.5. Melatoninin Farmakodinamik Özellikleri.....	25
II.2.5.1. Melatoninin Santral Etkileri.....	25
II.2.5.2. Melatoninin Antioksidan Etkileri.....	25
II.2.5.3. Melatoninin Endokrin Etkileri.....	26
II.2.5.4. Melatoninin Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Etkileri.....	27
II.2.5.5. Non Vasküler Düz Kaslardaki Etkileri.....	27
II.2.5. Pineal Bez ve Opiyaterjik Sistem.....	28
II.2.5.1. Pineal Bezin Opiyaterjik İnervasyonu.....	28
II.2.5.2. Pineal Bezdeki Opioid Reseptörlerin Varlığı.....	29

II.2.5.3. Melatoninin Analjezik Etkisi.....	30
II.2.6. NO ve Melatonin.....	32
II.2.6.1. NO Biyosentezi ve Etki Yerleri.....	32
II.2.6.2. Melatoninin NO Üzerine Etkileri.....	34
II.2.7. Melatoninin Tedavide Kullanım Alanları.....	36
III. MATERYAL VE YÖNTEM.....	38
III.1. Materyal.....	38
III.1.1. Kullanılan Deneysel Hayvanları.....	38
III.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanması.....	38
III.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	39
III. 2. Yöntem.....	40
III. 3. İstatistiksel Analiz.....	42
IV. BULGULAR.....	43
IV.1. KULLANILAN MADDELERİN TEK BAŞLARINA OLUŞTURDUKLARI % MOA DEĞERLERİ.....	43

IV.1.1 Kontrol Grubunda Ortaya Çıkan Nosisepsiyon.....	43
IV.1.2. Çözücünün (DMSO:SF ¼ (h/h)) Oluşturduğu Etkiler.....	43
IV.1.3. Melatoninin Oluşturduğu Etkiler.....	43
IV.1.4. Morfinin Oluşturduğu Etkiler.....	44
IV.1.5. L-NAME'in Oluşturduğu Etkiler.....	45
IV.1.6. L-argininin Oluşturduğu Etkiler.....	46
IV.1.7. Metilen Mavisinin Oluşturduğu Etkiler.....	46
IV.1.8. Naloksonun Oluşturduğu Etkiler.....	46
IV.2. KOMBİNASYONLARDA ORTAYA ÇIKAN % MOA DEĞERLERİ.	49
IV.2.1. Melatonin ile Oluşturulan Antinosiseptif Etkide Morfinin Rolü.....	49
IV.2.2. Melatonin ile Oluşturulan Antinosiseptif Etkide L-NAME'in Rolü.....	52
IV.2.3. Melatonin ile Oluşturulan Antinosiseptif Etkide Naloksonun Rolü.....	55
IV.2.4. Melatonin ile Oluşturulan Antinosiseptif Etkide L-Arjininin Rolü.....	56
IV.2.5. Melatonin ile Oluşturulan Antinosiseptif Etkide MM'nin Rolü.....	60
IV.2.6. Morfin ile Oluşturulan Antinosiseptif Etkiye L-NAME'in Etkileri.....	64
IV.2.7. Melatonin+Morfin+L-NAME Kombinasyonunun Etkileri.....	65

V. TARTIŞMA.....	69
VI. ÖZET.....	75
VII. SUMMARY.....	77
VIII. KAYNAKLAR.....	78
IX. ÖZGEÇMİŞ.....	103



I. GİRİŞ VE AMAÇ:

Melatonin, pineal bez tarafından salgılanan, organizmanın sirkadiyan ritmik organizasyonunu kontrol eden bir nörohormondur¹²¹. İnsanlarda dahil, pek çok türde melatoninin sirküle eden serum düzeyleri, gündüz çok düşük^{13,158} gece ise yüksek¹⁰ sirkadiyan bir ritm gösterir. Bu da melatoninin gece daha fazla sentezlendiğinin bir göstergesidir¹²¹. Pineal bez ve melatonin ultradiyan (24 saatten kısa ritimler), infradiyan (24 saatten uzun ritimler), sirkannual (mevsimsel) ritimler de gösterir¹²⁴. Ayrıca melatonin salgılanması ve salıverilmesi, patolojik durumlardan¹⁴², uyku bozukluğu¹²⁹, ilaç uygulaması¹⁰⁵, stres¹²⁰ gibi fizyolojik faktörler ve çevresel faktörlerden¹²³ etkilenerek değişir.

Melatonin, organizma üzerindeki etkisini hücre membranındaki spesifik reseptörleri ile etkileşerek gösterir. Bu yolla endokrin ve sirkadiyan etkiler oluşturur^{121,24}. Melatonin, gonadal ve tiroid fonksiyonunda görev alan hormonların hipofiz sekresyonlarını etkileyebilmektedir¹⁵¹. Melatoninin çok potent bir hidroksil radikali süpürücüsü olduğu, aynı zamanda glutatyon peroksidazı stimüle ettiği gösterilmiştir¹²¹. Ayrıca melatonin, sitotoksik bir anyon olan peroksinitrit süpürücüsüdür⁵². Melatoninin bu etkilerinden dolayı hücreyi oksidatif hasardan koruduğu öne sürülmüştür¹²¹.

Melatonin pineal bezin yanısıra¹²², retina¹⁰⁶, harderian bezleri (omurgalılarda orbital kavitedeki tubuloalveolar bezlerin büyük kısmı)⁹³ ve

Nitrik oksit sentaz enzimiyle L-Arjininden üretilen nitrik oksidin (NO) ağrı modellerinde santral ve periferel dual etkileri vardır. Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar melatoninin NO üretimini inhibe ettiğini göstermiştir¹¹².

Melatoninin daha önce yapılan çalışmalarda analjezik etkinliğı olduğu gösterilmiştir⁵⁴. Bu çalışmanın amacı, sıcak-plak (hot-plate) ağrı modeliyle melatoninin krononosisieptif etkilerini ve bu etkilerin NO ve opioid sistem ile ilişkisini araştırmaktır.



II. GENEL BİLGİLER

II.1. AĞRI

Ağrı, Latince “poena” sözcüğünden gelmekte ve bu sözcükte “ceza çekmek” veya “ceza, işkence” anlamına gelmektedir. Ağrının tanımı çeşitli şekillerde yapılmıştır. Uluslararası ağrı derneklerince kabul edilen ağrı tanımlaması şöyledir: Doku hasarı yapan veya yapabilecek şiddetteki uyarıların neden olabildiği koruyucu bir deneyimdir.

Ağrı subjektif bir duyu olarak en az beş kategoride sınıflandırılabilir. Buna göre ağrılar niteliklerine, kaynaklarına, sürelerine, şiddetlerine ve nedenlerine göre sınıflandırılabilir.

II.1.2. AĞRININ PERİFERİK VE SANTRAL MEKANİZMALARI

II.1.2.1. PERİFERİK AĞRI

Nosisepsiyonun, periferik ve nöronal mekanizmalarında rol oynayan komponentler ağrı reseptörleri ve ağrı sinir lifleridir.

II.1.2.1.1. Ağrı reseptörleri

Ağrı reseptörleri nosiseptörler adını alırlar. Nosiseptörler deri içinde ince serbest ve kapsülsüz sinir uçlarından ibarettir. Derin dokularda, ağrı reseptörlerinin sayısı daha azdır. Nosiseptörler doku hasarı yapan veya

yapabilecek kadar güçlü mekanik, termal veya kimyasal uyarılarla aktive olurlar. Mekanik stimülasyonla aktive olan reseptörlere “mekanonosiseptör”, termal stimülasyonla aktive olanlara “termonosiseptör”, kimyasal maddelerle stimülasyonla aktive olanlara da “kemonosiseptör” adı verilir.

Ağrı ancak A delta ve C aferent liflere bağlanan nosiseptörlerin uyarılması sonucu oluşmaktadır¹⁸.

Nosiseptör aktivasyonunda çeşitli nörotransmitterler ve P maddesi, kalsitonin gen-bağımlı peptid, nörokinin A ve glutamat gibi nöromodulatorlerin salıverilmesinde rol oynar⁷⁸. Nosiseptif bilginin iletiminde ilişkisi olduğu görülen bir çok reseptör subtipi vardır: α_2 -adrenoseptörler, taşikininler (P maddesi, nörokinin A), opioid (μ ve δ) ve glutamat (AMPA ve NMDA) reseptörler bu alt tiplere örnekler arasındadır⁹⁰.

Nosiseptörlerin duyarlılıklarının siklik adenosin monofosfat (sAMP) ve siklik guanozin monofosfat (sGMP) arasındaki denge ile kontrol edildiği ve NO'nun stimülasyonuna bağlı olarak sGMP düzeylerini artırarak ağrı mekanizmalarında rol oynadığı da gösterilmiştir¹⁰⁸.

II.1.2.1.2. Periferik Ağrı Sinir Lifleri

Ağrılı uyarı, nosiseptör membranında depolarizasyona yol açar ve bu da sinir impulsuna dönüşür. Bu süreç “transdüksiyon” olarak adlandırılır. Sinir impulsu periferik sinir aksonları ile iletilir. Periferik sinir aksonları, cevaplarına, miyelin içeriklerine ve iletim hızlarına göre üç gruba ayrılır.

Tablo 1. Periferik Sinir Liflerinin Özellikleri

Periferik Sinir Tipi	Akson Çapları	Miyelin İçerikleri	İletim Hızları
<i>A-β lifleri</i>	6-22 μm	Kalın miyelinlidirler	Hızla iletirler (33-75 m/saniye)
<i>A-δ lifleri</i>	2-5 μm	ince miyelinlidirler	Yavaştır (5-30 m/saniye)
<i>C lifleri</i>	0.3-3 μm	ince miyelinlidirler	Yavaştır (5-30 m/saniye)

Ağrıyı ileten aksonların çoğu miyelinsiz C lifleri ile A-delta tipi sinir lifleridir. Mekanoreseptör olanlar kuvvetli basınç sonucu aktive olurlar ve miyelinli A-delta sinir lifleri yapısındadırlar. Deride alıcı alanları oldukça küçüktür. Alıcı alanları 1 mm² den küçük 3-20 noktadan oluşurlar. Isı ve kimyasal ağrılı uyarılara cevap vermezler. Termoreseptörler miyelinli A-delta sinir lifi tipindedirler. Alıcı alanları 5 mm² den küçüktür. 45⁰C dan yukarı ısıyı algırlarlar. Kutanöz miyelinsiz nosiseptörler ise mekanik, termal, kimyasal stimüslara cevap verirler ve bu nedenle “C Polimodal nosiseptörler” olarak da adlandırılırlar. Bu üç ana grubun yanında basınç, soğuk gibi stimüslara cevap veren çeşitli nosiseptörler de vardır².

II.A.2.1.3. Omurilikte Ağrı İletimi

Nosiseptörlerin ağrıyı iletmedeki devamlılığı küçük çaplı miyelinli A- δ ve miyelinsiz C lifleriyle sağlanır. Böylece uyarılar omuriliğe (spinal kord) taşınırlar ve beyine ulaşmadan önemli ölçüde modifiye olurlar. Omurilikte omurilik gri maddesine girerler. Omurilik gri maddesi sitolojik olarak dokuz laminaya ayrılır. Fizyolojik çalışmalar her laminanın değişik karakteristiği olduğunu göstermiştir. Nosisepsiyonda lamina I, II ve V önemlidir.

Lamina I, A-delta primer afferent nosiseptörlerinin sonlandığı bölgedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu spinal seviyede iki fizyolojik tür nosiseptif duyuşal iletim nöronu gösterilmiştir: Bunlar nosiseptif spesifik (NS) ve Wide-Dynamic Range (WDR) nöronlardır. NS nöronları daha çok Lamina I'de lokalize olmuşlardır ve uyarının lokalizasyonu ve kalitesi ile ilgili bilgileri verirler. Bu kısımdaki hücrelerin esikleri oldukça yüksektir ve büyük kısmı kontralateral orta beyin ve talamusa projekte olurlar¹⁸.

Lamina II (substansiya gelatinosa), miyelinsiz C liflerinin sonlandığı bölgedir. Bu hücrelerin bir kısmı supraspinal bölgelere projekte olurlar.

Lamina V, bazı A-delta liflerinden direkt girdi alırlar. Burada, WDR nöronlar yoğundur. Çok hafif dokunma, bu hücrelerin aktivasyonu için yeterlidir. Lamina I ve II'ye uzanan dendritleri vardır. C ve A-delta liflerinden direkt ve Lamina I ve II'den ise indirekt girdi alırlar^{2,85}.

Vücudun somatik duyuşal informasyonu omurilik arka kökünden girer, arka kordon sistemi ve spinotalamik sistem halinde üç ayrı demet yaparak kortekse kadar uzanır. Arka kordon sisteminde somatik iletiyi kalın duyuşal A-

beta tipi lifler sağlar. Bunlar ventral ve spinotalamik demetler halinde omurilik boyunca talamusa kadar uzanarak, mekanoreseptif somatik duylardan olan dokunma, basınç, vibrasyon gibi taktil duyların taşınmasına aracılık ederler.

Spinotalamik sistem somatik duyu iletimi ile ilgili sistemdir. C tipi miyelinsiz ve A-delta tipi miyelinli duyu lifleri bu sistemin iki demetini oluşturur. Bu sinirler omurilik arka boynuzundan geçerek kolateral çaprazlaşır, ön ve yan kordon olarak talamus ve kortekse ulaşır. Sistem içerisinde bulunan birinci demete “neospinotalamik yolak (lateral)” denir. Nosisepsiyonun direkt yolu budur.

Spinoretiküloensefalik polisaptik yolak, sistemin indirekt nosisepsiyon yoludur. C lifleri yoğundur. Bu yolak, bulbus ve mezensefalunun retiküler formasyonunda sonlanır.

Deriye uygulanan bir ağırlı uyaran sonucu erken dönemde keskin ve batıcı ağırlı, geç dönemde de yanıcı ağırlı duylur. Keskin ve batıcı ağırlı A delta lifleriyle taşınır ve tip I ağırlı adını alır, yanıcı ağırlı da C lifleriyle taşınır ve tip II ağırlı adını alır³¹.

II.A.2.2. SANTRAL AĞRI

Ağrının santral mekanizmaları günümüzde tam anlamı ile açıklanamamıştır. Periferik olarak ortaya çıkan ve algılanan ağrının, omurilik anterolateral bölümü içerisinde santrale taşınması ve diskriminasyonu, ağırlı

iletiminde esas olan başlıca iki yol aracılığı ile gerçekleştirilir. Bunlar asendan (çıkan) ve desendan (inen) ağrı yollarıdır.

II.A.2.2.1 Çıkan Ağrı Yolları

Ağrı duyumsamasını beyin sapı ve talamusa aktaran arka boynuz nöronlarının aksonları, spinal gri maddede, orta hatta çaprazlaşırlar ve anterolateral beyaz maddede yukarı doğru yol alan spinotalamik traktusa katılırlar. Ağrı iletiminde rol alan talamik çekirdekler spesifik ve nonspesifik olarak sınıflandırılır. Spesifik çekirdekler ventralis posterior lateralis (VPL) ve ventralis posterior medialis (VPM). VPL spinotalamik traktustan, VPM ise trigeminal duyusal çekirdeklerden aferentleri alırlar. Bu çekirdekler hem ağrılı hem de ağrılı olmayan uyarılara cevap verme yeteneğine sahiptir ve WDR nöronları içermektedir.

Anterolateral nosiseptif yol iki sisteme ayrılabilir. Direkt spinotalamik sistem, ağrı ile ilgili ayırd edici duyuyu talamik düzeye iletir. Spinoretikülotalamik sistem ise beyin sapında sonlanır. Medulla oblongata'nın retiküler formasyonunda nükleus gigantosekülerise ulaşırlar; dorsolateral orta beyinde periakvaduktal gri madde, nükleus küneiformis ve parabrakial bölgede sonlanırlar^{2,85}.

Ağrının algılanmasında etkin olan kortikal bölgeler postsentral girusta lokalize olan I. ve II. somatosensoryal bölgeler ile anterior singulat kortekstir. Ağrının algılanmasıyla ilgili olduğu gösterilmiş bir diğer kortikal bölge de posterior parietal bölgedir¹³⁹.

II.2.2.2. İnen Ağrı Yolları

Yapılan önceki çalışmalar, arka boynuz hücrelerinin beyinden inen yollarla inhibe edildiği gösterilmiştir. Piramidal traktus ve retikülospinal sistem de içinde olmak üzere birçok beyin bölgesinden inen yollar ağrının modülasyonunda rol almaktadır. Orta beyinde, periakuaduktal gri bölgenin ağrı mekanizmasında rolü vardır ve bu bölgenin uyarılmasıyla hem insanlar hem de hayvanlarda güçlü analjezi sağlanmıştır. Bu sistemde monoaminlerin de rolü olduğu gösterilmiştir. Periakuaduktal gri maddenin uyarılması sonucu oluşan analjezi, serotonin ve dopamin konsantrasyonlarının artırılmasıyla güçlenmektedir. Ayrıca noradrenalin konsantrasyonunun artırılması periakuaduktal gri maddenin uyarılmasıyla elde edilen analjeziyi azaltmakta ve noradrenalin konsantrasyonunun azaltılması ise analjeziyi artırmaktadır. Periakuaduktal gri maddenin stimülasyonuna bağlı oluşan analjezinin nukleus raphe magnus bölgesinin aktivasyonu ile yönlendirildiği gösterilmiştir¹³⁹. Bu bölge serotonerjik etki ile ağrıyı inhibe etmektedir. Periakuaduktal gri madde hücreleri, Rostral Ventral Medulla (RVM)'nin çekirdeklerinde ilk sinapsını yapar. Daha sonra omuriliğin dorsal boynuzuna özellikle de V. laminaya ulaşır. Bu bölgelerde yoğunlukla endojen opioid peptitler ve opioid reseptörler bulunmaktadır⁸⁵.

II.A.4. DENEY HAYVANLARINDA AĞRI OLUŞTURMA YÖNTEMLERİ

Deneysel hayvanlarında ağrı ile ilgili sözel anlatım (ifade etme) olmayacağı için, ağrı tanımlaması ancak fizyolojik veya davranışsal

değişikliklerin bir yansıması olarak yapılabilmektedir. Genellikle deney hayvanlarında ağrı yanıtı yerine “nosisepsiyon” terimi kullanılmaktadır⁴⁰.

Deney hayvanlarında oluşturulan ağrı modelleri ile ilgili bilgiler Tablo 2’de verilmiştir.



Tablo 1. Deneysel Ağrı Modelleri

Kategori	Anajezik Etkinliği Ölçülen İlaç Grubu	Tipleri	Deneysel Hayvanı	Uygulama ve Süresi	Cevap
<i>Mekanik</i>	Narkotik	Kuyruk sıkıştırma (Tail clip) Randall Sellito	fare fare, sıçan	Kuyruk köküne arter penci, 30 dakika Pence plantar yüzeye veya kuyruk köküne basınç uygulanması	Farenin geriye dönüp penci çıkarma çabası Ağrıya karşı çirpinma veya cıyaklama
<i>Termal Uyarı</i>	Narkotik	Sıcak plak (Hot-plate)	fare, sıçan	Sıcak plak üzerine hayvan pençelerinin teması, 40-60 sn	Hayvanın zıplaması, pençelerini yalaması
<i>Elektriksel Uyarı</i>	Narkotik	Isıya karşı refleks çekme a)Radyan (tail flick) b)Sıcak/soguk likit banyo	fare, sıçan, tavşan fare, sıçan	Kuyruk veya kulak, 2-4 sn kuyruk	Kuyruk veya kulağı ısı kaynağından refleks çekme kuyruğu likit banyodan refleks çekme
<i>Kimyasal Uyarı</i>	Narkotik	Minimum uyarıcı voltajına tolerans	fare, sıçan, kobay, maymun, köpek	kulak, kornea, gasserian ganglion, diş pulpası	Minimum elektrik uyarısına karşı tolerans
<i>Kimyasal Uyarı</i>	Non-narkotik/ Narkotik	Kıvrınma-kramp (writhing)	fare, sıçan	Kimyasal uyarıcıyı takiben 15-20 dakika	Nosisepsiyona karşı tolerans

II.2. KRONONOBİYOLOJİ VE AĞRI

II.2.1. Kronobiyolojik Tanımlar

Yaşayan organizmaların fonksiyonel temeli “Homeostazis” kavramı ile açıklanmaktadır. Bu kavram ilk olarak Fransız fizyolog Claude Bernard tarafından ortaya atılmış ve Walter Canon tarafından geliştirilmiştir. Homeostazis yaşayan organizmalarda iç ortamın değişmezliği anlamına gelmektedir. Biyolojik organizasyonun fonksiyonel olarak sürüp gittiği zaman aralığındaki yaşamı bir ritme sahiptir. Biyolojik fonksiyonlardaki öngörülebilir ve düzenli tekrarlayan değişiklikler “biyolojik ritimler” olarak adlandırılmaktadır. Kronobiyoloji, tüm canlılardaki fizyolojik olayların, zamana bağlı olarak tekrarlayan, düzenli değişimlerini, yani biyolojik ritimlerini inceleyen bilim dalıdır. Biyolojik ritimlerin, frekans/periyod, akrofaz, batifaz, genlik ve bazal ortalama gibi karakterleri vardır⁶¹. Bu karakterler ile ilgili genel özellikler aşağıda açıklanmıştır.

Frekans/Periyod: Frekans; birim zamanda görülme sıklığıdır. Periyod ise olayın ne kadar süre ile tekrarladığını, bir çevrimini ne kadar sürede bitirdiğini gösterir. Ritimlerin adlandırılmasında periyodlar kullanılır. Biyolojik ritimlerde sık karşılaşılan frekans ritimleri Tablo 3’te gösterilmiştir. Ultradiyan ritimler saniyelerden başlayan ve 20 saate kadar süren ritimlerdir. EKG ve EEG kayıtlarında gözlenen ritimler ultradiyan ritimlerdir. İnsanlarda en sık rastlanan ritim ise 24 saatlik sirkadiyan ritimdir. Örneğin; vücut sıcaklığı¹¹⁸, bazı hormonların kan düzeyleri⁶⁸ ve kan basıncının günüçi değişimi sirkadiyan ritim

özelliği gösterir⁷⁶. Çevrimini 28 saatin üzerinde tamamlayan ritimler ise infradiyan ritimler olarak adlandırılır. Bunların en tipik örnekleri periyodu 30 ± 5 gün civarında olan menstrual siklus ile bazı memelilerde gözlenen kış uykusu (hibernasyon) ve göç davranışlarıdır⁶¹.

Tablo 3. Biyolojik Ritimlerde Sık Karşılaşılan Frekans Ritimleri⁶¹.

Ritim Alanı	Genişlik
Ultradiyan	$t < 20$ Saat (S)
Sirkadiyan	$20 S \leq t \leq 28 S$
İnfradiyan	$t > 28 S$
<i>Sirkaseptan</i>	$t = 7 \pm 3$ gün
<i>Sirkadiseptan</i>	$t = 14 \pm 3$ gün
<i>Sirkavijintan</i>	$t = 21 \pm 3$ gün
<i>Sirkatrivijintan</i>	$t = 30 \pm 5$ gün
<i>Sirkannual</i>	$t = 1$ sene ± 3 ay

Genlik (amplitude): Bir biyolojik ritimde, periyod içinde gözlenen en yüksek değerle en düşük değer arasındaki farktır. Eğer ritim sinus fonksiyonu ile ifade edilebiliyorsa yani sinusoidalite gösteriyorsa, denklemlerle elde edilen maksimum ve minimum değerler arasındaki farka genlik denir. Pratikte bu ritmi tanımlayan sinus fonksiyonunun denkleminde yararlanılarak hesaplanır.

Akrofaz ve Batifaz: Bir ritmik fonksiyonda genliği oluşturan parametrelerin yerleşim yerlerini gösteren ifadelerdir. Buna göre bir çevrim içinde en yüksek değer ortaya çıkma zamanına akrofaz, en düşük değer ortaya çıkma zamanına ise batifaz adı verilir. Örneğin; gündüz aktif olan kişilerde kan kortizol konsantrasyonu ritminin akrofazı sabah 06-08 saatleri arasında, batifazı

ise geceyarısı civarındadır¹⁵⁵. Akrofaz ve batifaz organizmanın içinde bulunduğu fonksiyonel durumu gösterirler.

Bazal Ortalama (Mesor): Ritmik değişimin belirlediği ortalama değere bazal ortalama denilir. Eğer gözlemler eşit aralıkla yapılmışsa aritmetik ortalamaya eşittir.

Biyolojik ritimleri karakterize eden bu özellikler yaş ve hastalıklar gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilirler. Örneğin; hipertansiyonlularda sistolik ve diastolik kan basıncında gözlenen sirkadiyan ritimlerin hem genliği hem bazal ortalaması normal kişilere nazaran yüksektir²⁸. Astmalılarda ise solunum yolları genişliğinde gözlenen ritmin bazal ortalaması normal kişilere nazaran düşük, genliği ise yüksektir¹⁴.

Çevremizdeki zaman belirleyici uyarılar değiştiğinde organizmadaki ritimler de ani bir değişikliğe uğramakta ve dışımızdaki zaman belirleyicilere uyum sağlamaktadır. Bu tür ritimlere eksojen ritimler denir. Bu uyarılara eksojen tempocu adı verilir. Eksojen uyarıcıların en önemlileri aydınlık, karanlık, aktivite veya dinlenme durumudur. Diğer yandan canlılarda endojen ritim uyarıcıları (circadian pacemaker) da vardır. Zira, eksojen uyarıcıların ortadan kalktığı durumlarda da ritimler devam edebilmektedir⁶¹. Sirkadiyan ritmisitenin endojen komponentinin vücut saati olarak da adlandırılan ve hipotalamusda bulunan Suprakiazmatik Nükleus (SKN) olduğu düşünülmektedir. Orta beyinde yer alan bir yapı olan ve melatonin salıverilmesinden sorumlu olan pineal bezin vücut zamanının oluşturulmasında ve

kontrolünde rol oynadığı yolunda kanıtlar bulunmaktadır¹². Melatonin sentezi akşam saatlerinde başlayarak ve gece boyu devam etmektedir, parlak ışık uyarısına maruz kalındığında ise baskılanmaktadır^{81,21}. Aydınlık/karanlık periyoduna ve sürekli karanlığa tabi tutulmuş kişilerde ölçülen üriner total katekolamin, 17-OH kortikosteroidler ve sodyum atılımı ile rektal vücut sıcaklığındaki günüçi ritimler birbirine benzemektedirler¹². Bu dört ritmin ortak özellikleri her iki grupta da uyku sırasında azalmaları, aktivite periyodunda ise artmış olmalarıdır. Deneylerdeki kişilerin sürekli karanlıkta bırakılmalarında da biyolojik ritimlerin değişmemesi, sayılan bu ritimler için tempocunun ekzojen değil, endojen tabiatta olduğunu göstermektedir. Buna karşın bazı ritimlerde, örneğin mevsimsel ritimlerde, ekzojen tempocu ışıktır. Birçok hayvandaki kış uykusu, göç ve üreme davranışı gibi ritimler hep ışık periyodunun uzunluğu ile düzenlenir. Karanlık periyodunu taklit edecek biçimde melatonin uygulanmasıyla bu mevsimsel davranışlar vaktinden önce de oluşturulabilir¹¹. Melatonin sentezi, etkileri ve ritmisitesi ile ilgili konulara daha sonra ayrıntılı olarak değinilecektir.

Genellikle aydınlık/karanlık ritmi ile çakışan uyku/uyanıklık ritmi, insanlardaki sirkadiyan ritimler için iyi bir tempocudur. Vardiya usulü çalışan kişilerde yapılan incelemelerde uyku/aktivite zamanlaması tersine döndüğünde ritimlerin yeni duruma 4-14 gün içinde adapte olduğu saptanmıştır¹²⁵. Yukarıda belirtildiği gibi gündüz aktif kişilerde kortizol ritminin akrofazı sabahın erken saatlerinde oluşmaktadır. Oysa karanlık periyodunda aktif olup aydınlıkta istirahat eden kemiricilerde kortizol ritminin akrofazı, insanlardakinin tersine karanlık periyodunun başlarında oluşmaktadır.

İnsan da dahil olmak üzere, canlılardaki zaman bağımlı organizasyonları göz önüne alınacak olursa, ilacın günün spesifik bir zamanında dozlanmasının yani kronoterapötik yaklaşımların ilacın etkinliğini artıracak ve yan etkilerini azaltacak ve hatta bozulmuş 24 saatlik profilin normalize edilmesini sağlayacak şüphesizdir.

II.2.2. Krononosisepsiyon

Krononosisepsiyon ağrı semptomundaki zaman bağımlı değişiklikleri ifade etmektedir. Ağrı duyumsamasının şiddeti günün içinde değişmektedir. Oluşan tepe ve çukur değerleri her hastalık için farklı bulunmuştur.

Ağrılı uyarana karşı yanıt eşiğindeki zamansal (temporal) değişikliklerle ilgili bilimsel çalışmalar XX. yüzyılın başlarında başlamıştır. Grabfielt ve Martin 1912-1914 yıllarında sağlıklı deneklerde elektriksel uyarıya karşı duyulan ağrının en çok saat 10³⁰'da, en az da saat 23³⁰-01⁰⁰ ve 04⁰⁰-05⁰⁰ arasında olduğunu göstermişlerdir^{57,88}. Procacci ve arkadaşları 1973-1974 yıllarında 34 sağlıklı denekte, radyan ısı ile ağrı oluşturmuşlardır. Sonuçta, saat 06³⁰ da maksimum ağrı oluştuğunu ve minimum ağrı duyumsamasının da bundan 12 saat sonra ortaya çıktığını bulmuşlardır^{114,115}.

Göbel ve Cordes 1990'da, perikranial kaslardaki ağrı duyumunda sirkadiyan değişiklikleri 12 erkek ve kadında araştırmıştır. Bu çalışmada ağrı, 24 saat boyunca altı kez, perikranial damarlardaki kan akımını kesecek bir basıncın

damarlar üzerine 20 saniye uygulanması ile elde edilmiştir. Ağrı, en azdan, en çoğa kadar 6 ayrı kategoride değerlendirilmiştir. Saat 14⁰⁰ de ağrının düşük hissedildiği ve saat 02⁰⁰ den sabaha kadar yavaş yavaş artarak yükseldiği saptanmıştır⁵³. Hummel ve arkadaşları 1992'de CO₂ ile oluşturulan ağrının kronobiyojisini çalışmışlardır. Bu çalışmada, gece saat 02⁰⁰ de ağrı eşiğinin yüksek olduğunu göstermişlerdir⁶³. Yine aynı yöntemle Kobal ve arkadaşları 24 saatlik periyodda iki tane ağrı tepe noktası tesbit etmişlerdir. Bunlar saat 10⁰⁰ ve 02⁰⁰ dir⁷². Deneysel ağrıda klinik yönden araştırılan sirkadiyan değişikliklerde, uygulanan metotlardaki farklılıklar, gönüllülerin uyku-uyanıklık kalıplarının senkronizasyonu ve ağrı metodunun standardizasyonun zor olması nedeniyle zıt sonuçlar elde edilmektedir^{99,137}. Kronobiyolojik çalışmalarda özellikle uyku-uyanıklık kalıplarının senkronizasyonu ve psikolojik faktörlerin standardizasyonu çok önemlidir. Tüm bu zorluklar, ağrı deneylerinin hayvanlarda yapılmasının nedenlerindedir.

Fredericson 1977'de sıcak plak testi kullanarak 12'şer saat aydınlık ve karanlık periyodunda tutularak senkronize edilmiş farelerde, ağırlı uyarana karşı verilen yanıtta zaman bağımlı değişiklikler tesbit etmiştir⁴⁸.

Martinez Gomez ve arkadaşları 1994'de, dişi sıçanlarda ağrı eşiğinin östrus dönemlerine bağlı olarak değiştiğini göstermişlerdir. Sıçanlarda tail-flick testi ile yapılan bu deneylerde maksimum ağrı eşiği, aktivite periyodunun erken döneminde bulunmuştur. Östrus dönemlerinde eşik düşük

bulunmuştur. Ancak hayvanlar overektomi yapılmış ve 24 saatlik ritimlerde bir değişiklik bulunmamıştır⁸⁹.

Bütün bu hayvan verileri, ağrının eşik ve duyarlılığının zaman bağımlı değişikliklerinin sadece fizyolojik nedenlerden olamayacağını ve kendine özel fizyolojik mekanizmalarını araştırmak için daha ileri çalışmaların gerekliliğini göstermektedir. Wesche ve Fredericson 1978-1981 yıllarında, fare beyinde met-enkefalin düzeylerine bakmışlar ve dinlenme zamanının sonunda, başına göre iki kat yükseklik bulmuşlardır¹⁵⁶. Endorfin ve enkefalinler, beyinde bulunan endojen peptitler olup ağrı oluşumunda rol alırlar. Ağrı duyarlılığı, hayvan sürekli ışığa maruz kaldığında değişmektedir¹⁰⁷. Naber'de insanlarda ve maymunda opioid aktiviteye bakmış, opioid substrat ve beta-endorfin düzeylerinin sirkadiyan değişiklikler gösterdiğini bulmuştur¹⁰⁵. Bu veriler, opioid reseptör bağlanmalarında zaman bağımlı değişikliklerin olduğunu ve farkın reseptör dansitesindeki günüçi değişikliklerden kaynaklandığını ortaya koymuştur¹⁰⁴.

P maddesinin, sıçan beyninin gri maddesinde ve Substantia Nigra bölgesindeki düzeylerinde sirkadiyan ritim olduğu ve saat 20⁰⁰ ile 04⁰⁰,de anlamlı yüksek olduğu gösterilmiştir⁷⁰.

Birçok hastalıkta da ağrı semptomları daha öncede belirtildiği gibi sirkadiyan değişiklik göstermektedir. Diş çürümleri nedeniyle diş ağrısı çeken 543 hasta incelendiğinde hissettikleri ağrı duyumsamasında sirkadiyan değişiklikler bulunmuştur. Hastaların diş ağrısının sabah saatlerinde başlayıp saat

08⁰⁰'de pik yaptığı bulunmuştur¹¹³. Migren ağrısı çeken hastalarda yapılan incelenmede migren ataklarının saat 08⁰⁰ ve 12⁰⁰ arasında arttığı ve saat 10⁰⁰ da pik, gece yarısında çukur oluşturduğu bulunmuştur¹³⁴. Ayrıca romatizmalı hastalarda yapılan ağrının kronobiyojik çalışmaları sonucu, romatoid artritli hastalarda ağrı akrofazının çoğunlukla günün ilk saatlerinde oluşurken⁷³, osteoartritli hastalarda günün sonunda oluştuğu¹⁷ bulunmuştur.

Günlük pratikte, ağrının maksimum giderilmesi ve maksimum cevap sağlayabilmek için daha ileri kronobiyojik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

II.2. PİNEAL BEZ VE MELATONİN

II.2.1. Pineal Bezin Lokalizasyonu ve Fizyolojik Özellikleri

Pineal bez, yaklaşık 12 mm uzunluğundadır ve korpus kallozumun arka ucu altındaki üçüncü ventrikülün tavanında yer alır. Habenulae adı verilen saplarla beyine bağlanmış durumdadır. Bebeklerde pineal bez daha iridir, puberteden önce gerilemeye başlar, ergenlik çağında son halini alır. Pineal bez pinealosit adı verilen özel hücrelerden oluşmuştur⁷⁷.

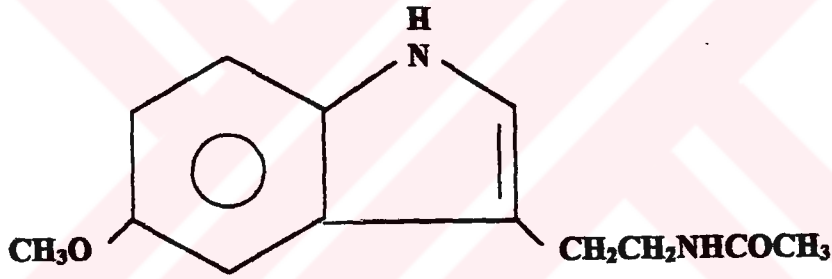
Omurgalılarda pineal bez, birçok biyokimyasal olayın kontrolü ve birçok fizyolojik fonksiyonun senkronize edilmesinden sorumlu biyolojik saat olarak görev yapar. Mevsimsel ritim gösteren kuşlar ve diğer hayvanlarda (örneğin: göçetme, yavrulama, kış uykusu), pineal bez dış çevrede meydana gelen değişiklikler arasında önemli bir bağlantı oluşturmaktadır. Ayrıca pineal bezin cinsel ve üreme fonksiyonlarında da düzenleyici rolü olduğu düşünülmektedir. Örneğin; kertenkelelerde yapılan pinealektomi sirkadiyan aktivitenin bozulmasına neden olurken, kuşlarda ise, kuşların mevsime bağlı üreme periyodunun kaybolmasına neden olmaktadır¹⁴⁶.

Pineal bez postgangliyonik sempatik sinirlerden innerve edilmektedir. Pineal beze gelen sempatik liflerin aktivitelerinin düzenlenmesinde aydınlık-karanlık periyodu önemlidir. Gözlerdeki ışık reseptörlerinden başlayan sinyaller retinohipotalamik liflerle suprakiazmatik çekirdeğe gelir.

Hipotalamustan aşağı inen yollar torakal omuriliğin intermediolateral gri kolonunda kavuşum yapar ve pregangliyonik sempatik nöronlar üzerinde sonlanır. Bu nöronlar da, süperior servikal gangliyonları innerve eder. Bu gangliyonlar pineal beze giden postgangliyonik nöronların doğduğu bölgedir. Pineal bezdeki adreseptörler, rodent ve insanlarda β_1 ve α_1 olarak karakterize edilmiştir. Bunun yanısıra rodent ve domuzlarda α_2 -adreseptörlerin varlığı da gösterilmiştir⁷¹.

II.2.2. Melatoninin Kimyasal Yapısı

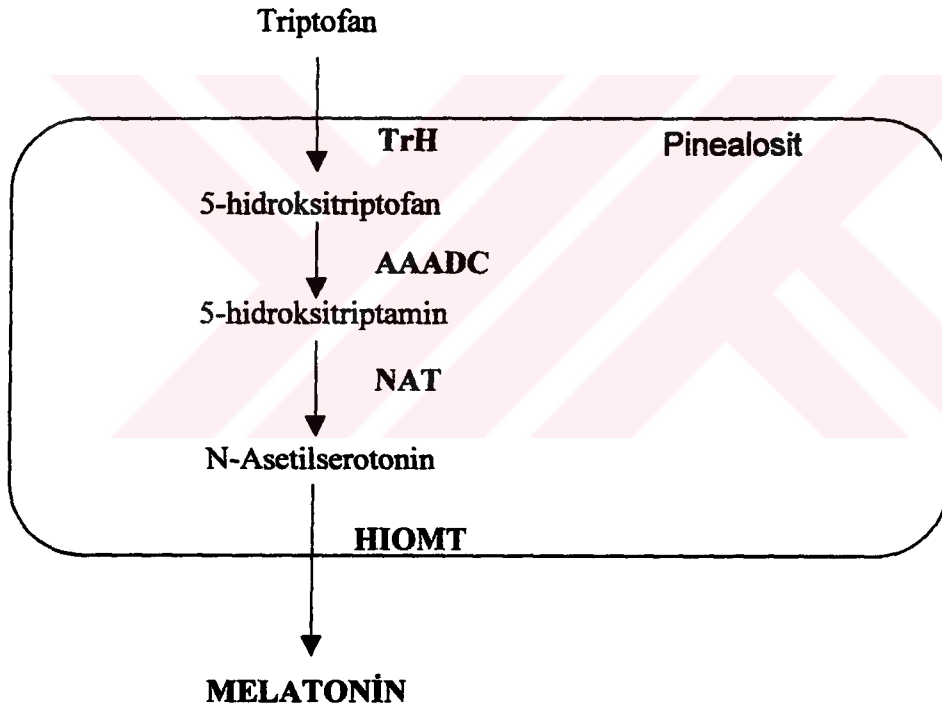
N-asetil-5-metoksitriptamin



II.2.3. Melatonin Biyosentezi

Melatonin biyosentezinin ve sekresyonunun sirkadiyan ritmi, omurgalıların biyolojik saatindeki sirkadiyan osilatörlerin direkt kontrolü altındadır²⁹. Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), birçok dokuda sentezlenir. Fakat ritmik sentezi öncelikle pineal bez ve retinada lokalizedir³⁰. Melatonin pineal bez¹²² ve retinanın yanısıra¹⁰⁸, Harderian bezleri (omurgalılarda orbital kavitedeki tubuloalveolar bezlerin büyük kısmı)⁹³ ve gastrointestinal bölgede^{62,161} de sentezlenir.

Melatoninin biyosentez yolağı triptofanla başlar. Triptofan ilk olarak triptofan hidroksilaz (TrH) enzimiyle hidroksillenerek 5-hidroksitriptofana, daha sonra 5-hidroksitriptofan da aromatik amino asit dekarboksilazla (AAADC) 5-hidroksitriptamine (serotonin, 5-HT) dönüşür. Gece, serotonin arilalkilamin N-asetiltransferaz (AANAT) enzimiyle N-asetillenerek N-asetilserotonine (NAS), NAS ise hidroksi-O-metiltransferaz (HIOMT) ile melatonine dnřrlr³⁰.



şekil 1: Melatonin biyosentez şeması

Bu biyosentetik yolağın sirkadiyan regülasyonu TrH, N-asetiltransferaz (NAT) ve HIOMT enzimleri için transkripsiyonal ve posttranskripsiyonal düzeylerde gerçekleşir¹⁹.

Sıçan pineal bezinde NAT formasyonu ve aktivasyonu postsinaptik α ve β reseptörler aracılığı ile düzenlenir⁷¹. Noradrenalin α_1 ve β_1 adrenoseptörler aracılığıyla etki göstererek pineal siklik nükleotitlerin (sAMP, sGMP) düzeylerini arttırır ve böylece NAT aktivitesini stimüle eder¹³⁸. Ayrıca melatonin sekresyonunun, servikal gangliyonlardan kaynaklanan sempatik inervasyondan noradrenalin salıverilmesi vasıtasıyla tetiklendiği ileri sürülmüştür. Pineal hormon olan melatoninin gece, pinealositlerdeki β -reseptörlerin noradrenerjik stimülasyonu aracılığıyla salıverildiği¹⁵⁷ ve melatonin sekresyonunun da β -bloker ilaçlarla inhibe edilebileceği gösterilmiştir^{36,59}. α_1 -adrenoseptörlerin aktivasyonu, β -adrenerjik stimülasyonu potansiye eder, fakat tek başına melatonin sekresyonunu etkilemez¹⁰².

Pineal bezde α_2 adrenoseptörler bulunur¹³⁰, fakat bunların fonksiyonları henüz tam olarak açıklanamamıştır. Presinaptik α -adrenerjik sistemin pineal sinir uçlarından noradrenalin salıverilmesini regüle ettiği gösterilmiştir¹⁰⁹. α_2 adrenoseptör agonisti klonidinin insanlarda nokturnal melatonin düzeylerini azalttığı⁸⁰ ve in vivo olarak sıçanlarda NAT aktivitesini azalttığı gösterilmiştir⁸. Bu bulgulara göre, pineal bezde presinaptik α_2 reseptörler aracılığı ile noradrenalin salıverilmesi inhibe olabilir ve buna bağlı olarak da melatonin düzeylerinde azalma söz konusudur.

Melatonin için üç reseptör alttipi gösterilmiştir. Bunlardan Mel_{1a} ve Mel_{1b} memelilerde gösterilmiştir. Mel_{1c} zebra balığı ve tavuklardan klonlanmıştır fakat memelilerde gösterilmemiştir. En son yapılan sınıflandırmaya göre Mel_{1a} reseptörü **mt1**, Mel_{1b} reseptörü **MT₂**, Mel_{1c} reseptörü ise **MT₃** olarak adlandırılmıştır⁴.

II.2.4. Melatoninin Farmakokinetik Özellikleri

Melatonin pineal bezde sentezlendikten sonra burada depolanmaz ve konsantrasyon gradiyenti doğrultusunda sistemik dolaşıma difüze edilir²². Melatoninin yaklaşık olarak %61'i plazma albuminine bağlanır. Daha sonra plazmadan diğer dokulara absorbe edilir. Melatonin oral olarak alındıktan 60 dakika sonra plazma pik düzeylerine erişir ve %74 ü ilk geçiş eliminasyonuna uğrar¹⁶². Karaciğer melatonin metabolize edilmesinde primer organdır. Melatonin 6-hidroksilasyonu takiben sülfat ve glukuronik asit konjugasyonu ile karaciğerde metabolize edilir²². Konjugasyon sonucunda suda çözünür bileşikler olan 6-sülfatoksimeletonin (aMT6s) ve 6-hidroksimeletoninglukoziduronikasit oluşur. Bu bileşikler idrarla atılırlar²². Melatoninin major metaboliti 6-sülfatoksimeletonindir ve bu metabolitin düzeyleri gece artar. 6-sülfatoksimeletonin düzeylerindeki artış melatonin gibi sirkadiyan pineal aktivitenin belirteci olarak kullanılabilir⁶⁰. Hormonun metabolize edilmemiş halde %1 i idrarda tespit edilmiştir²².

II.2.5. Melatoninin Farmakodinamik Özellikleri

II.2.5.1. Melatoninin Santral Etkileri

Melatoninin birçok termojenik proseste rol oynadığı ve nokturnal melatonin sekresyonunun parsiyel olarak vücut sıcaklığının azalmasına neden olduğu saptanmıştır⁷⁴.

Melatoninin beyinde GABAerjik nörotransmisyonu değiştirdiği ve benzodiazepin reseptörleriyle etkileştiği gösterilmiştir. Bu etkileri aracılığıyla antikonvülzan etki gösterdiği öne sürülmüştür¹⁰⁰. Ayrıca beyinde glutamat reseptörlerini ve NO üretimini inhibe ettiği buna bağlı olarak nöroprotektif ve antioksidan etki gösterdiği saptanmıştır⁹⁴. Antidepresan¹⁵³ ve hipnotik etkileri^{92,127} olduğu da saptanmıştır. Yüksek dozda melatonin uygulanmasının uykunun REM dönemini uzattığı ve melatoninin uykunun sirkadiyan regülasyonunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir³⁹. Başka bir çalışmada ise melatoninin uyku teşvik edici (sleep-promoting) etkili bir ajan olduğu saptanmıştır¹⁶⁴.

Melatoninin sahip olduğu analjezik aktivite ve bunun opiyaterjik sistem ile ilişkisi daha sonra ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

II.2.5.2. Melatoninin Antioksidan Etkileri

Melatoninin antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkileri olduğu gösterilmiştir. Melatoninin bu aktivitesi oksijen türevi serbest radikalleri bağlayan

indol yapısına bağlıdır¹³³. Melatoninin katalazı¹¹⁹ ve glutatyon peroksidazı stimüle ettiği gösterilmiştir¹²¹. Melatoninin çok potent bir hidroksil radikali süpürücüsü¹²¹ olduğu ve sitotoksik anyon olan peroksinitriti ortamdaki uzaklaştırdığı⁵² saptanmıştır. Ayrıca hipokloröz asit oksidasyonunu azalttığı⁸⁷, sinklet oksijeni tuttuğu²⁷ ve hipotalamik indüklenenbilir NOS aktivitesini anlamlı olarak azalttığı²⁰ gösterilmiştir. Bu etkilerinin, tanımlanmış olan spesifik melatonin reseptörleri aracılığıyla olmadığı ve bu etkilerinden dolayı hücreyi oksidatif hasardan koruduğu öne sürülmüştür¹²¹. Melatoninin tümör nekrozis faktör üretimini inhibe ettiği¹²⁸ ve sıçanlarda etanolle indüklenen gastroduodenal hasarı önlediği saptanmıştır⁹¹.

II.2.5.3. Melatoninin Endokrin Etkileri

Son yıllarda melatoninin nöroendokrin ve immün sistem ilişkisindeki düzenleyici rolü araştırılmaktadır. Melatonin ve diğer pineal indollerin (6-hidroksimelatonin, 5-metoksitriptofol) kortizol sentezini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca melatoninin 17,20-desmolaz aktivitesini artırarak 11-ketoandrostenedion ve 11- β -hidroksiandrostenedion düzeyini artırdığı saptanmıştır¹⁴¹.

Çeşitli çalışmalarda prolaktin, luteinleştirici hormon ve folikül uyarıcı hormon sekresyonunda pineal bezin rolü araştırılmıştır. Melatoninin bu hormonların sekresyonunu etkilediği yapılan çalışmalar tarafından öne sürülmüştür. Melatoninin sAMP ve Ca⁺² influksunun inhibisyonu yoluyla luteinleştirici hormon salıverilmesini inhibe ettiği gösterilmiştir¹⁴⁹. Başka bir

çalışmada ise östrojenin pineal adenilat siklaz aktivitesini inhibe ettiği ve dolayısıyla melatonin sentezini azalttığı gösterilmiştir¹⁰⁶. Ayrıca melatoninin östrojen reseptörlerini bloke ettiği de saptanmıştır¹¹⁷.

II.2.5.4. Melatoninin Kardiyovasküler Sistem Üzerindeki Etkileri:

Melatoninin insanlarda in vivo olarak ortalama sistolik ve diyastolik kan basıncını azalttığı gösterilmiştir²⁶. Ancak fizyolojik konsantrasyonlarda, sıçan izole kaudal ve serebral arterlerinde insan izole ve domuz izole koroner arterlerinde olduğu gibi vazokonstriksiyona neden olmaktadır⁸⁶. Melatoninin vasküler reaktiviteyi ve katekolamin düzeylerini azalttığı⁹ ayrıca iskemi reperfüzyon aritmelerini önlediği gösterilmiştir¹⁴⁰.

Sıçan kaudal arterinde melatoninin, dinlenme gerimini etkilemediği halde küçük (nM düzeyindeki) konsantrasyonlarda, noradrenalinle indüklenen kasılmaları potansiyalize ettiği ve kasılma süresini uzattığı gösterilmiştir¹⁵⁰. Melatoninin sıçan kuyruk arterinde, hem adrenerjik sinir stimülasyonu hem de fenilefrinle α_1 -adrenoseptör stimülasyonu ile oluşan kasılma cevaplarını stimüle ettiği gösterilmiştir⁷⁹. Melatoninin sıçan aortunda KCl ve metoksaminle oluşan kasılma cevabını inhibe ettiği ve klonidinin efikasitesini azalttığı gösterilmiştir¹⁵⁴.

II.2.5.5. Non Vasküler Düz Kaslardaki Etkileri:

İleum, jejunum, duodenum, kolon, çekum ve özefagusta melatonin bağlanma bölgeleri gösterilmiştir¹¹¹. Sıçan izole ileal düz kasında yapılan bir çalışmada melatoninin karbakolle stimüle edilen kasılmaları ve potasyum klorür

ile depolarizasyonu, konsantrasyon bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Melatoninin inhibitör etkisinin apamin ve verapamil varlığında ortadan kalktığı saptanmıştır¹²⁶. Kobay izole proksimal kolonunda yapılan bir çalışmada melatoninin direkt kastırıcı etkili olduğu gösterilmiştir⁸⁴.

II.2.5. Pineal Bez ve Opiyaterjik Sistem

II.2.5.1. Pineal Bezin Opiyaterjik İnervasyonu

Çeşitli hayvanlarda yapılan çalışmalar, pineal fonksiyonların düzenlenmesinde endojen opioidlerin rolü olduğunu ileri sürmüştür⁸³. Opiyaterjik peptidlerin melatonin sentezini etkilediğini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, des-tirozin-gama-endorfin, melatonin düzeylerini artırmış⁵⁰ ve morfin sıçan pineal bezinden melatonin salıverilmesini stimüle etmiştir^{42,47}. Ayrıca opioid antagonist olan naloksonun sıçan pineal melatonin içeriğinin nokturnal artışına etkisine bakıldığında, sıçan pineal melatonin içeriğinin saat 24⁰⁰de yaptığı pik değerinin nalokson uygulanan sıçanlarda anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur⁸³. Govitrapong ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada morfinin sıçan pineal bezinde NAT aktivitesinde ve melatonin düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir⁵⁵. Proopiomelanokortin, proenkefalin ve prodinorfin isimli üç prekürsörden türeyen opioid peptitlerin memeli pineal bezindeki varlığı radioimmunoassay yöntemlerle gösterilmiştir^{152,144,135,32}. İmmünohistokimyasal teknikler kullanılarak insan⁹⁸, kobay¹³¹, inek⁹⁵ ve Avrupa hamster³⁵ pineal bezinde opiyaterjik sinir liflerinin varlığı gösterilmiştir.

Tüm bu sonuçlar pineal melatonin sentezi ve etki mekanizmasında beyindeki endojen opioidlerin rolü olduğunu göstermektedir⁴³.

II.2.5.2. Pineal Bezdeki Opioid Reseptörlerin Varlığı

Gece melatonin düzeyi yüksek olduğunda, memeliler ağrıya daha az duyarlı olduğu için, uzun yıllardan beri analjezi, melatonin ve opioidler arasında bir etkileşim olduğundan şüphelenilmiştir⁴¹. Fraschini ve arkadaşları deney hayvanlarının gece morfin analjezisine daha duyarlı olduklarını göstermiştir. Yine bu grubun yaptığı çalışmada morfinin akut uygulanmasının sıçan ve insanda melatonin düzeylerini artırdığı gösterilmiştir⁴⁶.

Memeli pineal bezlerinde proenkefalin, prodinorfin ve proopiokortinden türeyen peptidleri içeren liflerin varlığı Schroder ve arkadaşları tarafından (1988) gösterilmiştir. Schroder kobay pineal beziyle yaptığı çalışmada, pineal bezdeki nöronlarda olduğu gibi pinealositlerde de proenkefalin veya prodinorfinden türeyen çeşitli immünoreaktif opioid peptidlerin varlığını göstermiştir¹³¹.

Govitrapong ve arkadaşları, [³H]-diprenorfin ve diğer opioid reseptör ligandları kullanarak sığır pineal bezinde opioid reseptörlerin varlığını saptamışlardır. Ayrıca opioid agonist ve antagonistlerini kullanarak morfinin N-asetil transferaz aktivitesini stimüle ettiğini bundan dolayı melatonin oluşumunu artırdığını ve bu etkinin naloksonla bloke edildiğini göstermişlerdir^{55,56}. Bu çalışmayı takip eden çalışmalarda [³H]-diprenorfin bağlanmasının %50

inhibisyonu için gereken ilaç konsantrasyonları şöyle bulunmuştur: naltrekson> fentanil> nalokson> nalbufin> morfin> DAGO> dinorfin> met-enkefalin. Pineal bezdeki opioid reseptörler çoğunlukla delta birazda mü opioid subtipleridir^{7,6}.

II.2.5.3. Melatoninin Analjezik Etkisi

İnsanlarda melatoninin sirküle eden düzeylerinin. gündüz çok düşük gece ise yüksek olduğu daha önce belirtilmişti. Gece hastaların ağrı şikayetlerinin daha az olduğu ve analjeziklere gece daha az gerek duydukları doktor ve hemşireler tarafından uzun yıllardır bildirilmektedir³³. Benzer olarak onkolojistler de, kanser ağrısı çeken hastaların gün boyunca narkotiklerin ekstra dozlarını istediklerini belirtmişlerdir²³. Nörojenik veya idiyopatik ağrı gibi kronik ağrılı hastaların saat 02⁰⁰ de serum melatonin düzeylerinin sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak daha düşük olduğu gösterilmiştir⁵.

Melatoninin analjezik etkisi Golombek ve arkadaşları tarafından sıcak-plak ağrı yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Melatonin, 20-40 mg/kg dozlarda denenmiştir. Maksimum analjezik etkiyi 20 mg/kg'da oluşturduğu tespit edilmiştir. Günün içinde saat 12⁰⁰ de minimum analjezik etki oluştururken saat 20⁰⁰ de maksimum analjezik etki oluşturduğu gösterilmiştir. Nalokson ve benzodiazepin antagonisti Ro-15-1788, melatoninin analjezik etkisinin duyarlılığını saat 20⁰⁰ de inhibe etmişlerdir, fakat bu inhibisyon anlamlı bulunmamıştır⁵⁴. Ayrıca, pinealektomi, melatoninin analjezik etkisini geri çevirmiştir; bu etki melatonin uygulanmasıyla tersine çevrilmiştir⁶⁵. Winters ve arkadaşları ise melatoninin analjezik etkisinin mevsimsel değişikliğini

incelemişler ve yazın (Mayıs, Haziran, Temmuz) melatonin tarafından oluşturulan analjezinin kış (Ekim, Kasım, Aralık) aylarında anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir¹⁶⁰.

Pineal bezin biyosentez aktivitesi yaşla birlikte azalır. Genç, erişkin ve yaşlı farelerde morfin analjezisine bakıldığında, gün boyunca genç farelerde yaşlılara göre anlamlı olarak daha fazla analjezi olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, kısa süreli ışığa maruz bırakılarak ve intraperitoneal olarak aromatik L-aminoasit dekarboksilaz inhibitörü benserazid (5-hidroksitriptamin oluşumuna engel olarak pineal aktiviteyi inhibe eder) uygulayarak melatonin düzeyleri azaltıldığında, morfinin analjezik etkisindeki nokturnal artış ortadan kalkmıştır. Benserazid ve ışığa maruziyetten önce melatonin uygulanması morfinin analjezik etkilerini anlamlı olarak artırmıştır⁶⁶.

Wikner ve arkadaşları kronik idiyopatik ağrı sendromu olan, fibromiyalji sendromu olan kadın hastalarda yaptıkları çalışmada, bu hastaların serum ve idrar melatonin düzeylerini saat 18⁰⁰-08⁰⁰ ve 23⁰⁰-07⁰⁰ saatlerinde incelemişlerdir. Serum melatonin düzeyleri kontrol gruplarına göre saat 23⁰⁰-07⁰⁰ arasında alınan örneklerde anlamlı olarak farklı iken idrar örneklerinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Fibromiyalji sendromu olan hastalarda serum serotonin ve triptofan düzeylerinin düşük olması ve serotonin/triptofanın melatonin analogları olmaları bu hastalarda melatonin sekresyonundaki azalmayı açıklayabilir¹⁵⁹.

II.2.6. NO ve Melatonin

II.2.6.1. NO Biyosentezi ve Etki Yerleri

NO birçok fizyolojik fonksiyona sahip önemli bir biyodüzenleyici mediyatördür. NO, -152°C den düşük sıcaklıklarda gaz halindedir. Birçok solvanda çözünür fakat sudaki çözünürlüğü düşüktür ve hücre membranından kolaylıkla geçebilir ve yarı ömrü 3-50 saniyedir. Bugün, bu inorganik gazın fizyolojik haberci olarak sinir, immün ve kardiyovasküler sistemlerde önemli bir düzenleyici olduğu bilinmektedir. Damar endotelinden gevşetici bir faktörün salıverildiği, ilk kez 1980 yılında Furchgott ve Zawadzki tarafından. noradrenalin ile kastırılan sıçan aorta halkalarının, asetilkolin ile stimülasyonu sonrasında gözlenmiş ve önceleri bu faktör “Endotel Bağımlı Gevşetici Faktör” (Endothelium-Derived Relaxing Factor, EDRF) olarak tanımlanmıştır⁴⁹. EDRF'nin yapısı üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, etkilerinin çoğunun NO ile benzer olduğu ortaya çıkmış ve 1987 yılında Ignarro ve arkadaşları EDRF'nin NO olabileceğini öne sürmüşlerdir⁶⁴.

NO, NOS enziminin etkisiyle, yarı-esansiyel bir amino asit olan L-arjininin terminal guanidino atomlarının, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)'nin katalitik etkinliği ile N-oksidasyonu sonucu oluşmaktadır⁴⁴.

NO'nun etkilerinin hemoglobin, metilen mavisi (MM) ve hidrokinon gibi ajanlarla inhibe edildiği ve ayrıca bu etkilere guanilil siklaz (GS) stimülasyonunun sonucunda intraselüler sGMP düzeyinin yükselişinin aracılık ettiği gösterilmiştir¹¹⁶.

NO sentezini tetikleyen NOS enzimini, sitokrom P-450 redüktazlara benzer hem içeren bir enzimdir. NOS'un çeşitli alt tipleri, özellikleri, fonksiyonları ve düzenlenmeleri ile ilgili çalışmalardan elde edilmiş geniş bir bilgi birikimi mevcuttur. Buna göre NOS'un, konstitütif (kNOS), immünolojik stimülasyonla indüklenebilir (iNOS) ve ayrıca periferik sinir sistemi, omurilik ve beyinde gösterilen NOS (bNOS), endotelial NOS (eNOS), makrofaj ve makrofaj olmayan iNOS gibi alt tipleri vardır^{51,132}. NOS izoformları bazı araştırmacılar tarafından I, II, III olarak da adlandırılmıştır⁴⁵.

L-arjininden NO üretimi, N^ω-hidroksi L-arjinin oluşumuyla sürdürülür. Bu L-arjinin-NO yolağı bazı L-arjinin analoglarıyla inhibe edilebilir. Bu analoglar içinde ilk önce, N^ω monometil L-arjinin (L-NMMA) tanımlanmıştır. NO sentezini inhibe eden diğer ajanlar arasında şu analoglar bulunmaktadır: N^ω-nitro-L-arjinin (L-NA), N^ω-amino-L-arjinin (L-NAA), 7-nitroindazol (7-NI), N^δ-iminoetil-L-ornitin (L-NIO) ve N^G-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME). L-arjinin analoglarının çoğu hem konstitütif hem de indüklenebilir NOS'u kompetitif olarak inhibe ederler¹⁴⁸.

Nitro vazodilatörler NO salıverilmesine neden olarak etki gösterdikleri için bu grup bileşikler NO donörleri olarak adlandırılmaktadır. Bu bileşikler organik nitatlar, nitritler, inorganik nitrozo bileşikler, sidnoiminler, S-nitrozotiyollerdir⁴³.

NO, vasküler endotel hücrelerde kimyasal bir stimülasyon sonucu veya fiziksel bir stimülasyonla oluşur ve kan akımı ve basıncının düzenlenmesi

için gerekli olan vazodilatör tonüsü sürdürür. NO endotelde ve/veya trombositlerde oluşur. Trombosit agregasyonunu ve adhezyonunu ile lökosit adhezyonunu inhibe eder; düz kas hücre proliferasyonunu da modüle eder. NO, santral sinir sisteminde nöronlarda sentezlenir, ağrı modülasyonu, nöronal aktivite ve kan akımı arasındaki koordinasyon hafıza formasyonu gibi birçok fizyolojik fonksiyonda nöromediyatör rolü oynar. Beyin ve omurilikte NOS aracılığıyla oluşan NO, sGMP artışı sonucunda nosisepsiyon indüklenmektedir. Yeni rutenyum bileşikleriyle yapılan bir çalışmada formolin ile indüklenen ağrı cevaplarının nörojenik ve inflamasyon fazında Complex II isimli rutenyum bileşiği antinosiseptif etki göstermiştir. Bu etki L-arjininle anlamlı olarak tersine çevrilmiştir. Bu da L-arjinin-NO yolağının nosiseptif proseslerde rolü olduğunu göstermektedir¹⁶. NO'nun fizyolojik etkileri solubl guanilat siklazın aktivasyonu ile oluşur ve hedef hücrelerde siklik guanisin monofosfat konsantrasyonundaki artışın sonucudur. Ayrıca, NO immünolojik reaksiyonlarda, konakçının savunma mekanizması harekete geçince büyük miktarlarda oluşur. NO süperoksit anyonu ile birleşerek peroksinitrit oluşumuna neden olur ve septik şok ve inflamasyon gibi patolojik durumlarda rol oynar⁹⁶.

II.2.6.2. Melatoninin NO Üzerine Etkileri

NO'in santral ve periferik sinir sisteminde sinaptik iletimde ve birçok fizyolojik olayda rol aldığı daha önce belirtilmişti. Maan-Yuh Lin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sıçan pineal bezinde NOS aktivitesini incelemişlerdir. Bunun için işaretli L-arjinin ile inkübe edilmiş sıçan pineal bez

kültürleri kullanılmıştır. Pineal bezde oluşan işaretli sitrülün ($[^3\text{H}]$ sitrülün miktarlarına noradrenalin ve L-NAME'in etkileri incelendiğinde noradrenalinin $[^3\text{H}]$ sitrülün miktarlarını anlamlı olarak artırdığı ve bu artışın L-NAME ile inhibe edildiği görülmüştür. Ayrıca aynı çalışmada pineal bezdeki NOS'un tipinin incelenmesi için yapılmış diğer bir deneyde NOS aktivitesi üzerine serbest Ca^{++} iyonları, kalmodulin antagonisti trifloperazin ve L-NAME'in etkileri araştırılmıştır. Serbest Ca^{++} iyonları NOS aktivitesini artırırken, trifloperazin ve L-NAME. NOS aktivitesini azaltmıştır. Bu sonuçlar, pineal bezdeki NOS'un Ca-kalmodulin bağımlı NOS olduğunu göstermektedir. Yine aynı çalışmada L-NAME ve noradrenalinin NAT aktivitesini anlamlı olarak etkilemediği bulunmuştur⁸². Sıçan serebellar NOS aktivitesi üzerine melatoninin etkileri incelendiğinde melatoninin fizyolojik konsantrasyonlarda NOS aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur¹¹². Ayrıca melatoninin in vitro çalışmalarda NO üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir^{112,38,37}. Melatonin, sıçanda lipopolisakkaritin indüklediği ateş ve susuzluğu anlamlı olarak inhibe etmiştir. Ayrıca melatonin korteks. diensefalon ve beyin sapında, nitrik oksit sentaz aktivitesini doz bağımlı olarak inhibe etmiştir. Bu etki, melatonin reseptör antagonisti luzindol tarafından engellenmiştir¹⁰⁵. Zimosanla aktive edilmiş plazma ile indüklenen sıçan pençe ödeminde melatoninin koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir³⁴.

Melatoninin nitrik oksit ile etkileşmesi inflamasyon çalışmalarında araştırılmasına karşın, ağrı ile ilgili çalışmalarda melatonin etkilerinde nitrik oksitin rolünün bulunup bulunmadığı incelenmemiştir.

II.2.7. Melatoninin Tedavide Kullanım Alanları

Melatoninin antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkisi nedeniyle Alzheimer, Parkinson hastalığı ve iskemi-reperfüzyon hasarında yararlı olabileceği öne sürülmüştür¹³³. Ayrıca melatoninin insanlarda epilepsi nöbetlerini azalttığı ve bu nedenle epilepsi tedavisinde yararlı olabileceği gösterilmiştir⁹⁴.

Melatoninin immüno-hematopoetik rolü olduğu ve bu etkisinden dolayı gram-negatif septik şoktan korunma sağladığı, stresle indüklenen immünodepresyonu önlediği ve hemorajik şoktan sonra immün fonksiyonu yeniden düzenlediği saptanmıştır.

Kıtalararası uçuş (jet lag), vardiya çalışması (shift work) ve körlük gibi ritim bozukluğu nedenlerine karşı klinikte kullanılmaktadır. Ayrıca uykusuzlukta da yararlı olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir. Melatoninin kontrasepsiyonda başarılı olarak kullanılabilmesi de bildirilmiştir²⁵.

Gastrointestinal bölgede melatoninin gastrik ülserlerin insidansını azalttığı ve mukozal lezyonlar ve diyare gibi kolit semptomlarını önlediği gösterilmiştir²⁵.

Koroner kalp hastalığı olan bireylerde gece melatonin düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir, fakat bu bulguların klinikteki önemi henüz bilinmemektedir¹¹⁰.

Ayrıca melatoninin kanser tedavisinde diğer ajanlarla kombine halde veya tek başına kullanıldığı ve neoplastik hastalıkların belirlenmesinde diagnostik ve prognostik bir ajan olabileceği gösterilmiştir²⁵.



III. MATERYAL VE YÖNTEM

III.1. Materyal

III.1.1. Kullanılan Deneş Hayvanları

Deneşlerde, Hıfzıssıhha serum çiftliği ve fakültemizin hayvan yerinde üretimi yapılan 16-40 g ağırlığında, 12'şer saat aydınlık (08⁰⁰-20⁰⁰) ve karanlık (20⁰⁰-08⁰⁰) periyodunda tutularak senkronize edilmiş, albino erkek fareler kullanılmıştır.

III.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanması

Melatonin (MT) (Sigma)

Serum fizyolojik (SF) (%0,9 NaCl) (GATA)

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck)

Morfin klorür (TMO-Toprak Mahsulleri Ofisi)

L-Arjinin (Sigma)

L-N^G-nitroarjinin metilester (L-NAME) (Sigma)

Metilen Mavisi (MM) (Sigma)

Nalokson (Sigma)

Melatonin günlük olarak DMSO(%100):SF (1:4 h:h)'te çözülerek hazırlanmıştır. L-NAME, morfin, nalokson ve MM günlük olarak SF'te çözülerek hazırlanmıştır ve ışıktan korunarak +4 °C'de saklanmıştır.

III.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler:

a) Maddelerin Hazırlanması İçin Gerekenler:

Hassas terazi (Sartorius, Japonya)

Üstten kefeli terazi (Sartorius, Japonya)

Otomatik pipet (Socorex, İsveç)

Parafilm

Vortex (Nüve, Türkiye)

b) Sıcak-plak (Hot-plate) ile Oluşturulan Ağrı Modelinde, Nosiseptif Aktivite

Tayini İçin Gerekenler:

Steril enjektör (1 ml)

Cam tüp (20 ml)

Sıcak-plak (Mikro Hot-plate, mod 792, Türkiye)

III. 2. Yöntem

Analjezik aktivite tayininde Lakin ve arkadaşları tarafından 1981'de tanımlanan sıcak-plak (hot-plate) (55 ± 1 °C) aljezi modeli kullanılmıştır⁷⁵. Deneysel günün 4 farklı saatinde (09⁰⁰, 15⁰⁰, 21⁰⁰, 03⁰⁰) yapılmıştır.

Melatonin, saat 21⁰⁰ de sıcak-plaktan 30 dakika önce 5, 10, 20 ve 40 mg/kg dozlarda uygulanarak oluşturduğu etki incelenmiştir. Elde edilen sonuç doğrultusunda maksimum analjezik etki oluşturduğu doz olan 20 mg/kg seçilmiştir.

Deney gruplarına sıcak-plaktan 30 dakika önce melatonin (20 mg/kg, i.p.), morfin (10 mg/kg, i.p.)⁵⁸, nalokson (10 mg/kg, i.p.)⁵⁴; 60 dakika önce L-NAME (40 mg/kg, i.p.)⁵⁸ ve 15 dakika önce L-Arjinin (2 mg/kg, i.p.)¹⁴⁵, MM (40 mg/kg, i.p.)¹⁴⁵ yine günün 4 farklı saatinde uygulanmıştır. Kontrol gruplarına SF uygulanmıştır.

Kombinasyon grupları da yukarıda belirtilen günün 4 farklı saatinde, melatonin (20 mg/kg, i.p.)+morfin (10 mg/kg, i.p.), melatonin (20 mg/kg, i.p.)+L-NAME (40 mg/kg, i.p.), melatonin (20 mg/kg, i.p.)+nalokson (10 mg/kg, i.p.), melatonin (20 mg/kg, i.p.)+MM (40 mg/kg, i.p.), melatonin (20 mg/kg, i.p.)+L-Arjinin (2 mg/kg, i.p.), melatonin (20 mg/kg, i.p.)+morfin (10 mg/kg, i.p.)+L-NAME (40 mg/kg, i.p.) ve L-NAME (40 mg/kg, i.p.)+morfin (10 mg/kg, i.p.) şeklinde uygulanmıştır.

Gerek SF gerekse madde uygulanan hayvanlarda, sıcak-plak uygulaması sırasında hayvanların ilk cevap zamanları kaydedilmiştir. İlk cevap zamanı için farelerde gözlenen başlıca davranış karakteristikleri şunlardır:

- Zıplaması
- Cam fanusun kenarına tırmanması
- Pençelerini yalması

İlk cevap zamanı üzerinde test maddelerinin gösterdiği etki % Maksimum Olası Analjezi (% MOA) olarak değerlendirilmiştir. Bu % değer aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ MOA} = [(T_{sn} - K_{sn}) / (KZ_{sn} - T_{sn})] \times 100$$

T: Madde uygulamasından sonra tespit edilen ilk cevap zamanı

K: SF uygulamasından sonra tespit edilen ilk cevap zamanı

KZ: Kesme Zamanı (40 sn)

Daha sonra açısal % cevapların normalizasyonu için gerekli dönüşüm transformasyonu ve her bir % MOA değerine $X = \arcsin \sqrt{x}$ formülü uygulanması ile gerçekleştirilmiştir ($x = \% \text{ MOA}$).

Melatonin uygulanan gruplarda; DMSO:SF ¼ (h/h) için hesaplanan % MOA değerleri, melatonin uygulanan gruplar için hesaplanan % MOA değerlerinden çıkarılarak Δ Analjezi hesaplanmıştır. Sonuçlar % MOA olarak ifade edilmiştir.

$$\Delta\text{Analjezi} = \% \text{MOA}_{(\text{melatonin})} - \% \text{MOA}_{(\text{DMSO:SF})}$$

III. 3. İstatistiksel Analiz

a) Kontrol ve deney gruplarında tespit edilen ilk cevap zamanı, *ortalama±ortalamaların standart hatası* şeklinde ifade edilmiştir.

b) Gerek ilk cevap zamanı ve gerekse % MOA değerlerinin istatistiksel anlamlılık testleri için tek yönlü ANOVA uygulanmıştır. Grupların post hoc karşılaştırılmalarında Students-Newman-Keuls çoklu karşılaştırılmalar testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

c) Kronogramlarda gözlenen tepe ve çukur değerler arasındaki farklılık Student's t testi ile değerlendirilmiştir. $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

IV. BULGULAR

IV.1. KULLANILAN MADDELERİN TEK BAŞLARINA OLUŞTURDUKLARI % MOA DEĞERLERİ

IV.1.1 Kontrol Grubunda Ortaya Çıkan Nosisepsiyon

Kontrol grubunda gözlenen ortalama ilk cevap zamanları, saat 09⁰⁰ da 6.44 ± 0.45 (n=10), 15⁰⁰ de 4.6 ± 0.43 (n=10), 21⁰⁰ de 4.58 ± 0.62 (n=10) ve 03⁰⁰ de 4.3 ± 0.67 (n=10) olarak bulunmuştur. İlk cevap zamanları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P > 0.05$).

IV.1.2. Çözücünün (DMSO:SF ¼ (h/h)) Oluşturduğu Etkiler

DMSO:SF ¼ (h/h) ile yapılan deneylerde elde edilen % MOA değerleri saat 09⁰⁰ da -6 ± 3.08 (n=12), 15⁰⁰ de 2.27 ± 3.13 (n=10), 21⁰⁰ de 19.66 ± 3.93 (n=10) ve 03⁰⁰ de 10.4 ± 2.67 (n=10) olarak bulunmuştur. Elde edilen tepe (saat 21⁰⁰) ile çukur (saat 09⁰⁰) değeri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur ($F=11.94$, $P < 0.05$).

IV.1.3. Melatoninin Oluşturduğu Etkiler

Melatonin 20 mg/kg dozda maksimum antinosiseptif etki oluşturmuştur. Melatoninin bu dozda oluşturduğu günüçi profili araştırılmıştır. Melatoninle oluşan %MOA değerlerinin kronogramları şekil 2'de gösterilmiştir. Bu değerler sırasıyla saat 09⁰⁰ da -8.85 ± 0.83 (n=10), 15⁰⁰ de -7.24 ± 2.67 (n=10), 21⁰⁰ de 15.96 ± 2.92 (n=12) ve 03⁰⁰ de 3.5 ± 0.247 (n=10) olarak

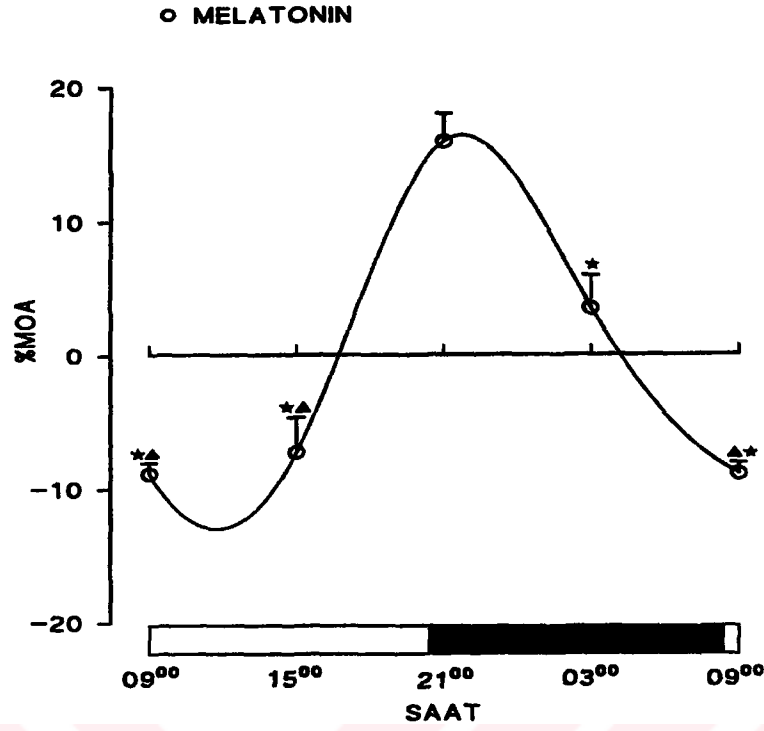
bulunmuştur. Kronogramı incelendiğinde melatoninin oluşturduğu % MOA etkisinin günüçi ritim gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen tepe (saat 21⁰⁰) ile çukur (saat 09⁰⁰) değeri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur (P<0.05).

IV.1.4. Morfinin Oluşturduğu Etkiler

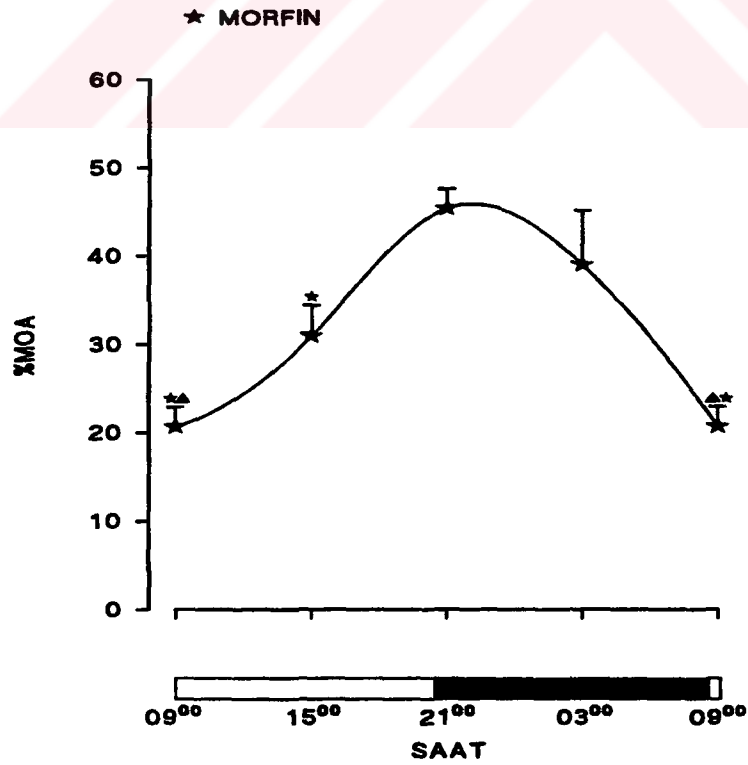
Morfin 10 mg/kg dozda kullanıldığında ortaya çıkan % MOA şekil 3'de gösterilmiştir. % MOA, saat 09⁰⁰ da 20.6±2.26 (n=10), 15⁰⁰ de 30.89±3.48 (n=10), 21⁰⁰ de 45.31±2.23 (n=10) ve 03⁰⁰ de 38.89±6.17 (n=10) olarak bulunmuştur. Günüçi ritim gösteren bu verilerin, tepe (saat 21⁰⁰) ve çukur (saat 09⁰⁰) değerleri arasındaki farklılık istatistiksel anlamlı bulunmuştur (P<0.05).

IV.1.5. L-NAME'in Oluşturduğu Etkiler

L-NAME 40 mg/kg dozda kullanıldığında ortaya çıkan % MOA şekil 4'de gösterilmiştir. % MOA, saat 09⁰⁰ da 7.8±2.19 (n=10), 15⁰⁰ de 16.67±1.79 (n=10), 21⁰⁰ de 31.12±3.38 (n=10) ve 03⁰⁰ de 18.2±0.66 (n=10) olarak bulunmuştur. Ortaya çıkan kronogramda günüçi ritim gözlenmiştir. Tepe (saat 21⁰⁰) ve çukur (saat 09⁰⁰) değerleri arasındaki farklılık istatistiksel anlamlı bulunmuştur (P<0.05).



Şekil 2. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde melatonin (20 mg/kg) uygulamasıyla oluşan %MOA'nın günüçi değişimi. ★ 21⁰⁰'dan farklı, ▲ 03⁰⁰'dan farklı (F=30,632, P<0.0001)



Şekil 3. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde morfin (10 mg/kg) uygulamasıyla oluşan %MOA'nın günüçi değişimi. ★ 21⁰⁰'dan farklı, ▲ 09⁰⁰'dan farklı (F=7.546, P=0.0005)

Hayvanlar 12:12 (aydınlık:karanlık) periyodunda bekletilmiştir. Siyah barlar karanlık periyodunu göstermektedir (şekil 2,3).

IV.1.6. L-argininin Oluşturduğu Etkiler

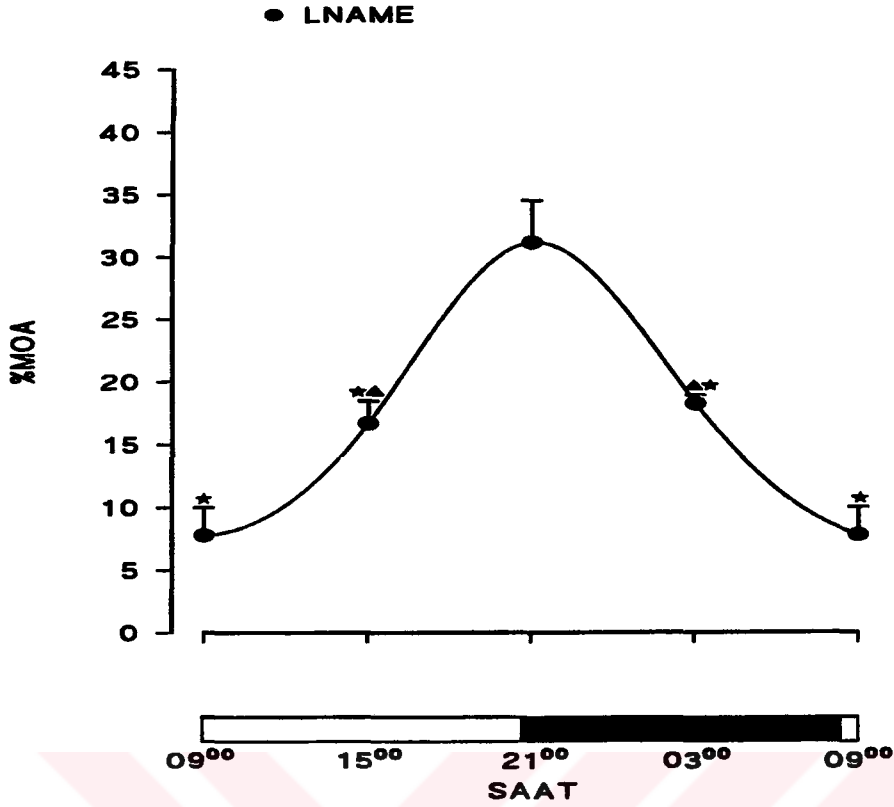
L-arginin 2 mg/kg dozda kullanıldığında ortaya çıkan % MOA şekil 5'de gösterilmiştir. % MOA, saat 09⁰⁰ da -11.8 ± 1.69 (n=10), 15⁰⁰ de -4.3 ± 2.83 (n=10), 21⁰⁰ de -16.04 ± 3.57 (n=10) ve 03⁰⁰ de -4.91 ± 2.12 (n=10) olarak bulunmuştur. Günüçi ritim gösteren bu verilerin, tepe (saat 15⁰⁰) ve çukur (saat 21⁰⁰) değerleri arasındaki farklılık istatistiksel anlamlı bulunmuştur (P<0.05).

IV.1.7. Metilen Mavisinin Oluşturduğu Etkiler

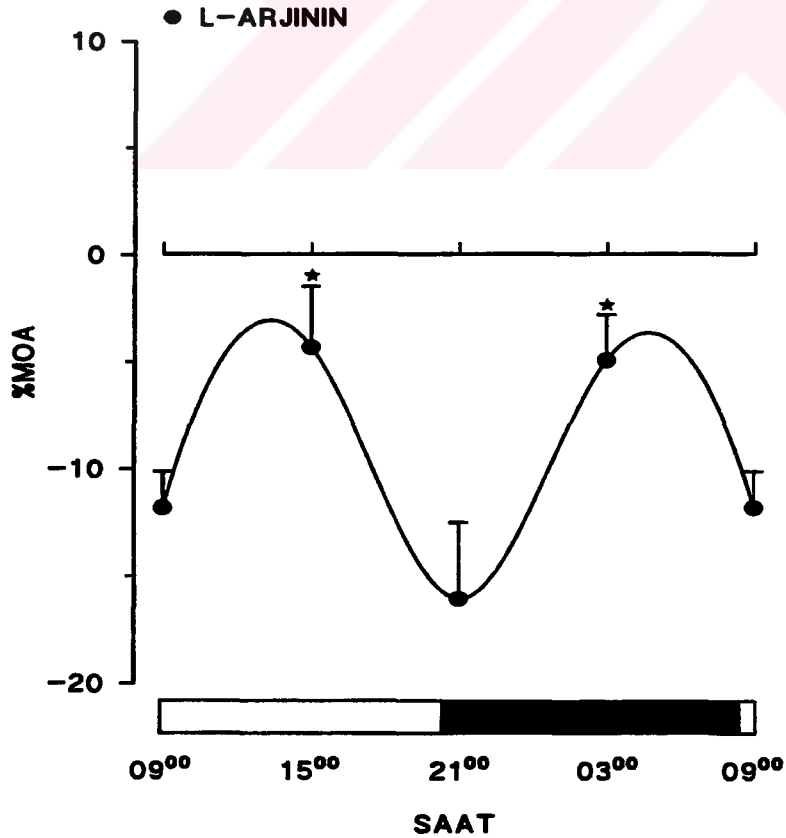
MM 40 mg/kg dozda kullanıldığında ortaya çıkan % MOA şekil 6'de gösterilmiştir. % MOA, saat 09⁰⁰ da -7.7 ± 2.84 (n=10), 15⁰⁰ de 11.14 ± 1.6 (n=10), 21⁰⁰ de 6.61 ± 2.5 (n=10) ve 03⁰⁰ de 11.88 ± 3.51 (n=10) olarak bulunmuştur. Günüçi ritim gösteren bu verilerin, tepe (saat 03⁰⁰) ve çukur (saat 09⁰⁰) değerleri arasındaki farklılık istatistiksel anlamlı bulunmuştur (P<0.05).

IV.1.8. Naloksonun Oluşturduğu Etkiler

Nalokson 10 mg/kg dozda kullanıldığında ortaya çıkan % MOA şekil 7'de gösterilmiştir. % MOA, saat 09⁰⁰ da -10.48 ± 2.12 (n=10), 15⁰⁰ de 13.66 ± 4.93 (n=10), 21⁰⁰ de 13.24 ± 1.05 (n=10) ve 03⁰⁰ de 0.77 ± 2.97 (n=10) olarak bulunmuştur. Günüçi ritim gösteren bu verilerin, tepe (saat 15⁰⁰) ve çukur (saat 09⁰⁰) değerleri arasındaki farklılık istatistiksel anlamlı bulunmuştur (P<0.05).

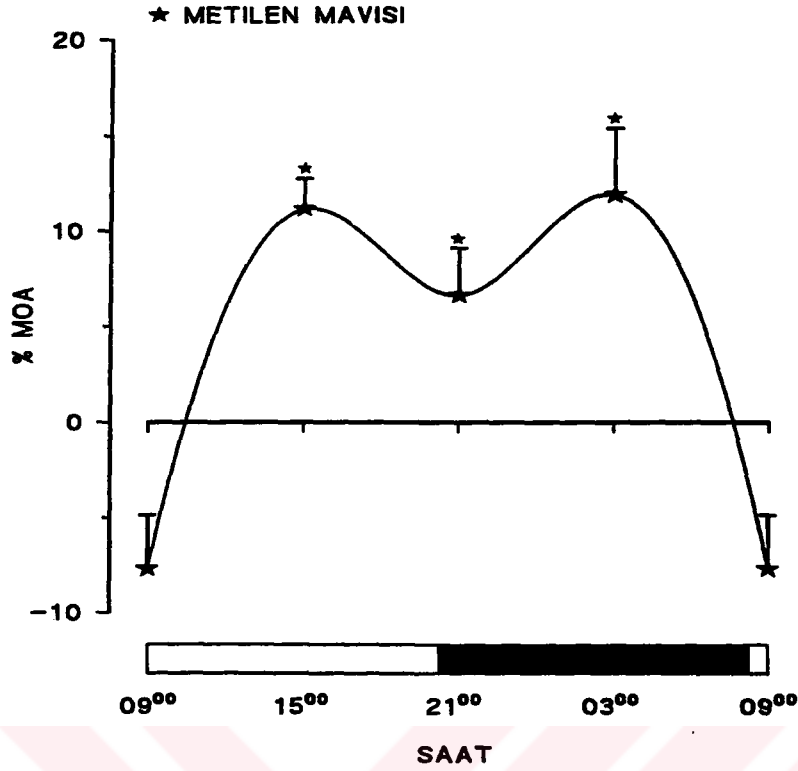


Şekil 4. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde L-NAME (40 mg/kg) uygulamasıyla oluşan %MOA'nın günüçi değişimi. ★ 21⁰⁰'dan farklı, ▲ 03⁰⁰'dan farklı (F=18.609, P<0.0001)

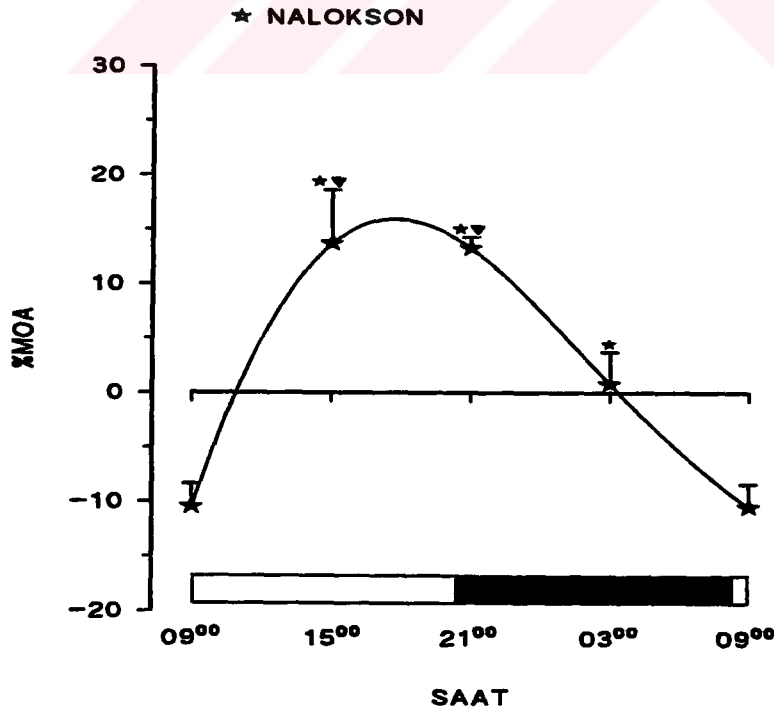


Şekil 5. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde L-arjinin (2 mg/kg) uygulamasıyla oluşan %MOA'nın günüçi değişimi. ★ 21⁰⁰'dan farklı (F=4.55, P<0.05).

Hayvanlar 12:12 (aydınlık:karanlık) periyodunda bekletilmiştir. Siyah barlar karanlık periyodunu göstermektedir (Şekil 4,5).



Şekil 6. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde metilen mavisi (40 mg/kg) uygulamasıyla oluşan %MOA'nın günüçi değişimi. ★ 09⁰⁰'dan farklı, (F=11.32, P<0.05)



Şekil 7. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde nalokson (10 mg/kg) uygulamasıyla oluşan %MOA'nın günüçi değişimi. ★ 09⁰⁰'dan farklı, ▼ 03⁰⁰'dan farklı (F=13.72, P<0.05)

Hayvanlar 12:12 (aydınlık:karanlık) periyodunda bekletilmiştir. Siyah barlar karanlık periyodumu göstermektedir (Şekil 6,7).

IV.2. KOMBİNASYONLARDA ORTAYA ÇIKAN % MOA DEĞERLERİ

IV.2.1. Melatonin ile Oluşturulan Antinositif Etkide Morfinin Rolü

a) Melatonin+Morfin Kombinasyonunun Etkileri:

Melatoninin oluşturduğu etki profiline morfinin katkısını araştırmak için bir grup fareye sıcak-plak uygulamasından 30 dakika önce melatonin (20 mg/kg, i.p.)+morfin (10 mg/kg, i.p.) kombinasyonu uygulanmıştır. % MOA değerleri şekil 8a da gösterilmiştir. Bu değerler saat 09⁰⁰ da 40.24±3.75 (n=12), 15⁰⁰ de 83.4±25.26 (n=10), 21⁰⁰ de 50.48±14.03 (n=10) ve 03⁰⁰ de 19.84±2.44 (n=10) olarak bulunmuştur. Kronogramda görülen tepe (saat 15⁰⁰) ile çukur (saat 03⁰⁰) değeri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur (P<0.05).

b) Melatonin+Morfin Kombinasyonunun Etkileri ile Tek Başlarına Morfin ve Melatoninin Etkilerinin Karşılaştırılması:

Her üç grubun oluşturdukları % MOA değerleri arasında yapılan anlamlılık testlerinde şu sonuçlar bulunmuştur (şekil 8b):

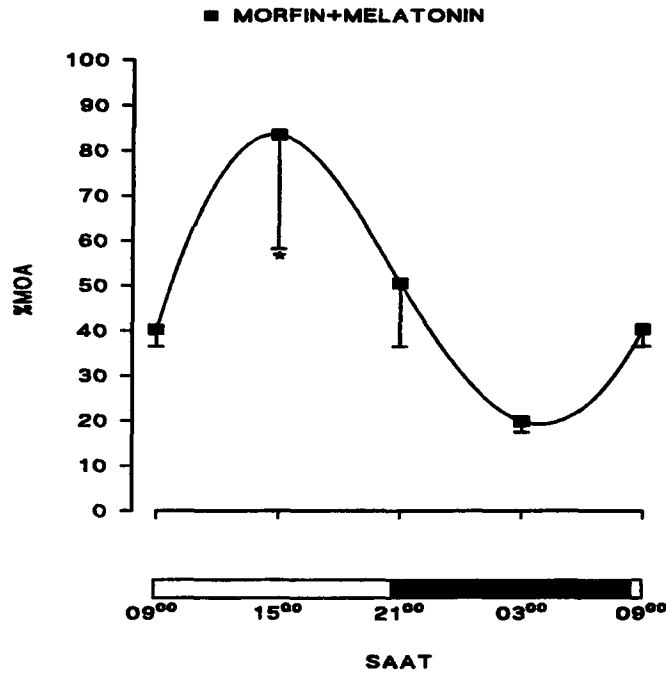
- Saat 09⁰⁰: Melatonin ve morfinin tek başlarına % MOA değerlerinin çukur oluşturduğu zaman dilimi saat 09⁰⁰ dur. Bu saatte melatoninin tek başına oluşturduğu %MOA, morfin ile kombine kullanıldığında istatistiksel anlamlı olarak potansiyalize olmaktadır (P<0.05).

- **Saat 15⁰⁰**: Kombinasyonun % MOA değeri saat 15⁰⁰ de tepe oluşturmaktadır. Bu saatte melatonin ve morfinin tek başlarına oluşturdukları antinosiseptif etki birlikte kullanıldıklarında istatistiksel anlamlı olarak potansiyalize olmaktadır (P<0.05).

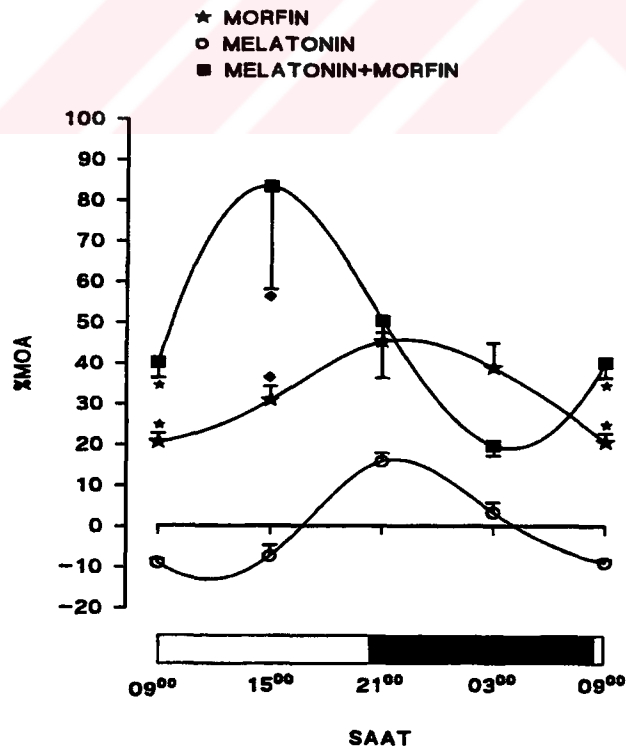
- **Saat 21⁰⁰**: Melatonin ve morfin tek başlarına % MOA değerlerinin tepe oluşturduğu zaman dilimi saat 21⁰⁰ dir. Bu saatte melatoninin tek başına oluşturduğu antinosiseptif etkide morfinle birlikte kullanıldığında artış olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (P>0.05).

- **Saat 03⁰⁰**: Kombinasyonun % MOA değeri saat 03⁰⁰ de çukur oluşturmaktadır. Melatonin ve morfinin antinosiseptif etkilerindeki birlikte kullanıldıklarında oluşan artış istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (P>0.05).

Bu sonuçlar, melatonin ile morfin kombine edildiğinde, morfinin melatoninin etkilerini ve günüçi ritmisitesini değiştirdiğini ortaya koymaktadır. Melatonin ve morfin tek başlarına kullanıldığında tepe değeri saat 21⁰⁰ de, çukur değeri saat 09⁰⁰ da oluşurken kombine kullandıklarında tepe değeri saat 15⁰⁰,e çukur değeri ise saat 03⁰⁰ e kaymıştır.



Şekil 8a. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde melatonin (20 mg/kg)+morfin (10 mg/kg) uygulamasıyla oluşan %MOA'nın günüçi değişimi. ★ 03⁰⁰'dan farklı (F=3.471, P=0.0253)



Şekil 8b. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde melatoninin oluşturduğu etkiler üzerine morfinin etkileri. ★ melatoninin 09⁰⁰'den farklı, ◆ melatoninin 15⁰⁰'den farklı (F=9.252, P<0.05).

Hayvanlar 12:12 (aydınlık:karanlık) periyodunda bekletilmiştir. Siyah barlar karanlık periyodunu göstermektedir.

IV.2.2. Melatonin ile Oluşturulan Antinosiseptif Etkide L-NAME'in Rolü

a) Melatonin+L-NAME Kombinasyonunun Etkileri:

Melatoninin oluşturduğu etki profiline L-NAME'in katkısını araştırmak için bir grup fareye sıcak-plak uygulamasından önce melatonin (30 dakika, 20 mg/kg, i.p.)+L-NAME (60 dakika, 40 mg/kg, i.p.) kombinasyonu uygulanmıştır. %MOA değerleri şekil 9a'da gösterilmiştir. %MOA değerleri saat 09⁰⁰ da -4.36 ± 1.92 (n=10), 15⁰⁰ de -7.63 ± 2.7 (n=10), 21⁰⁰ de -20.05 ± 3.2 (n=10) ve 03⁰⁰ de -5.47 ± 2.34 (n=10) olarak bulunmuştur. Kronogramda görülen tepe (saat 09⁰⁰) ile çukur (saat 21⁰⁰) değeri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur (P<0.05).

b) Melatonin+L-NAME Kombinasyonunun Etkileri ile Tek Başlarına L-NAME ve Melatoninin Etkilerinin Karşılaştırılması:

Her üç grubun oluşturdukları % MOA değerleri arasında yapılan anlamlılık testlerinde şu sonuçlar bulunmuştur (şekil 9b):

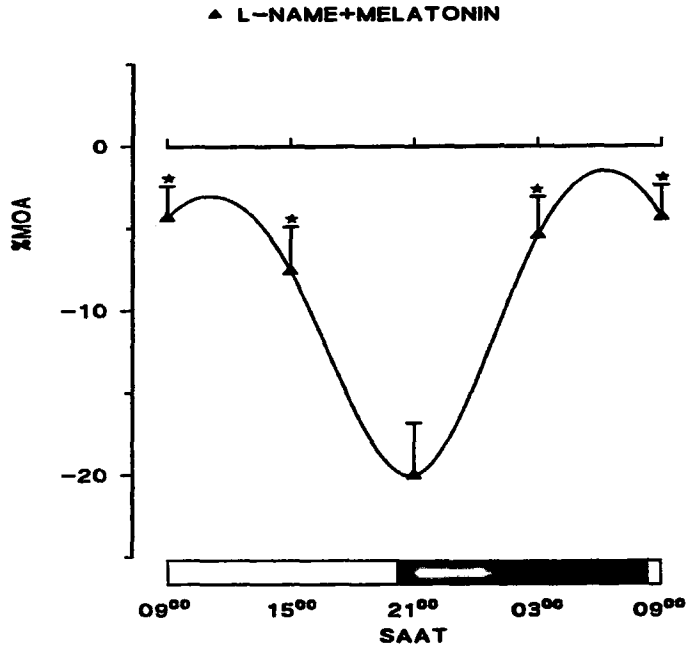
- Saat 09⁰⁰: Melatonin ve L-NAME tek başlarına kullanıldıklarında % MOA değerleri saat 09⁰⁰ da çukur değer oluştururken, kombinasyon grubu % MOA değeri tepe oluşturmaktadır. Bu saatte melatonin L-NAME ile kombine edildiğinde melatoninin tek başına gösterdiği % MOA etkisindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. L-NAME'in tek başına gösterdiği % MOA etkisinde ise istatistiksel anlamlı olarak azalma bulunmuştur (P<0.05).

- **Saat 15⁰⁰**: Bu saatte melatoninin tek başına oluşturduğu % MOA değerleri kombinasyon grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak değişmezken ($P>0.05$), L-NAME'in tek başına oluşturduğu % MOA etkisi melatonin ile kombine edildiğinde istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır ($P<0.05$).

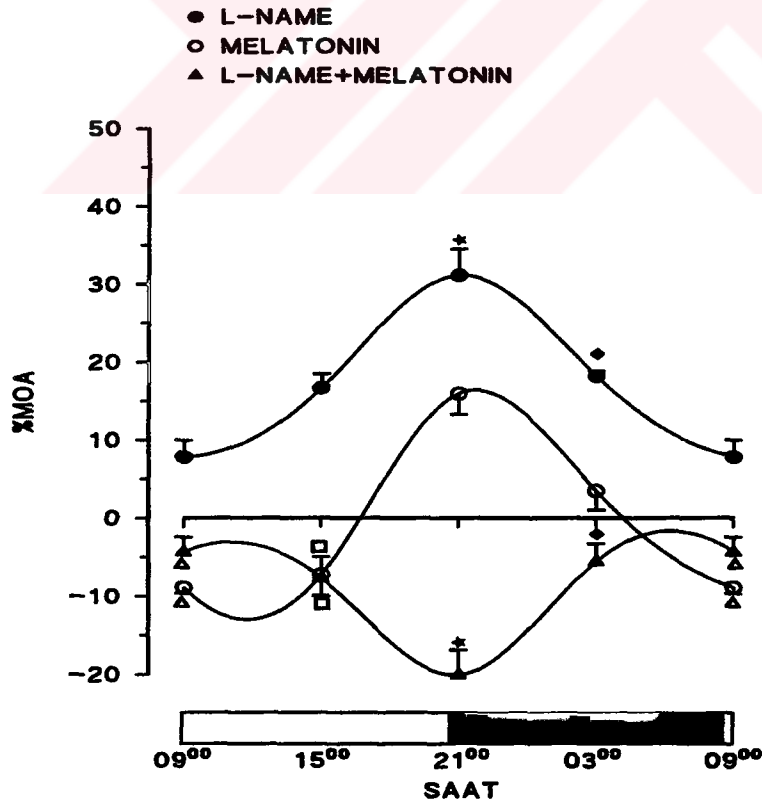
- **Saat 21⁰⁰**: Saat 21⁰⁰ de melatonin ve L-NAME tek başlarına oluşturdukları % MOA değerleri tepe oluştururken, kombinasyon grubu % MOA değerleri çukur oluşturmuştur. Bu saatte melatoninin tek başına oluşturduğu antinosisseptif etki L-NAME tarafından anlamlı olarak tersine (nosisseptif etki) çevrilmiştir ($P<0.05$).

- **Saat 03⁰⁰**: Melatonin ve L-NAME'in bu saatteki etkilerinin kombine edildiklerinde istatistiksel anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($P<0.05$).

Bu sonuçlar, melatonin ile L-NAME ile kombine edildiğinde, L-NAME'in melatoninin etkilerini ve günüçi ritmisitesini değiştirdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 9a. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde melatonin (20 mg/kg)+L-NAME (40 mg/kg) uygulamasıyla oluşan %MOA'nın günüçi değişimi. ★ 21⁰⁰'den farklı (F=7.863, P=0.0004)



Şekil 9b. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde melatoninin oluşturduğu etkiler üzerine L-NAME'in etkileri. ★ melatoninin 21⁰⁰'den farklı, Δ L-NAME 09⁰⁰'den farklı, L-NAME 15⁰⁰'den farklı ◆ melatoninin 03⁰⁰'den farklı (F=40.746, P<0.0001).

Hayvanlar 12:12 (aydınlık:karanlık) periyodunda bekletilmiştir. Siyah barlar karanlık periyodunu göstermektedir.

IV.2.3. Melatonin ile Oluşturulan Antinosiseptif Etkide Naloksonun Rolü

a) Melatonin+Nalokson Kombinasyonunun Etkileri:

Melatoninin oluşturduğu etki profiline naloksonun katkısını araştırmak için bir grup fareye sıcak-plak uygulamasından 30 dakika önce melatonin (20 mg/kg, i.p.)+naloksan (10 mg/kg, i.p.) kombinasyonu uygulanmıştır. % MOA değerleri şekil 10a'da gösterilmiştir. Bu değerler saat 09⁰⁰ da -4.51 ± 1.83 (n=10), 15⁰⁰ de -3.8 ± 2.97 (n=10), 21⁰⁰ de -22.18 ± 3.33 (n=10) ve 03⁰⁰ de -11.97 ± 3.3 (n=10) olarak bulunmuştur. Kronogramda görülen tepe (saat 15⁰⁰) ile çukur (saat 21⁰⁰) değeri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur (P<0.05).

b) Melatonin+Nalokson Kombinasyonunun Etkileri ile Tek Başlarına Nalokson ve Melatoninin Etkilerinin Karşılaştırılması:

Her üç grubun oluşturdukları % MOA değerleri arasında yapılan anlamlılık testlerinde şu sonuçlar bulunmuştur (şekil 10b):

- **Saat 09⁰⁰:** Melatonin ve naloksonun tek başlarına % MOA değerlerinin çukur oluşturduğu zaman dilimi saat 09⁰⁰ dur. Bu saatte melatonin nalokson ve birlikte kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunamamıştır (P>0.05).

- **Saat 15⁰⁰:** Kombinasyon ve naloksonun % MOA değeri saat 15⁰⁰ de tepe değeri oluşturmaktadır. Naloksonun antinosiseptif etkisi bu saatte kombinasyon grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı olarak azalmaktadır (P<0.05).

- **Saat 21⁰⁰**: Melatonin % MOA değerinin tepe, kombinasyonun % MOA değerinin çukur değeri oluşturduğu saattir. Melatonin ve naloksonun oluşturdukları antinosiseptif etki ikisi birlikte kullanıldıklarında nosisepsiyona dönüşmektedir (P<0.05).

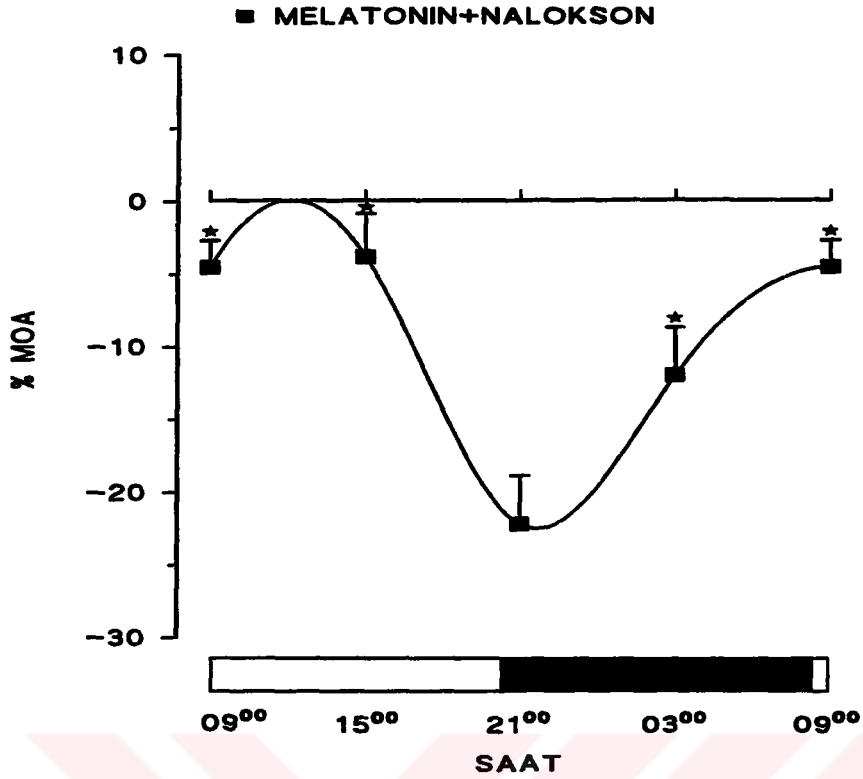
- **Saat 03⁰⁰**: Bu saatte melatonin ve naloksonun birlikte kullanılması melatonin ve naloksonun etkisini anlamlı olarak azaltmakta ve nosiseptif etki oluşurmaktadır (P<0.05).

Bu sonuçlar, melatonin ile naloksonun birlikte kullanıldığında, naloksonun melatoninin etkilerini ve guni ritmisitesini değiştirdiğini ortaya koymaktadır.

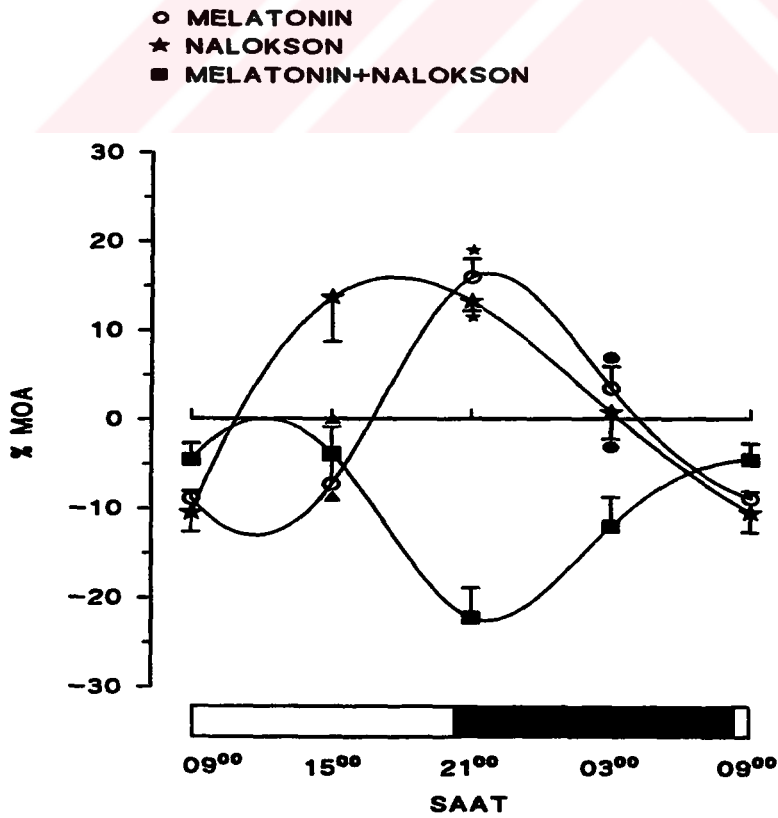
IV.2.4. Melatonin ile Oluşturulan Antinosiseptif Etkide L-Arjininin Rolü

a) Melatonin+L-Arjinin Kombinasyonunun Etkileri:

Melatoninin oluşturduğu etki profiline L-arjininin katkısını araştırmak için bir grup fareye sıcak-plak uygulamasından önce melatonin (30 dakika, 20 mg/kg, i.p.)+L-arjinin (15 dakika, 2 mg/kg, i.p.) kombinasyonu uygulanmıştır. % MOA değerleri şekil 11a'da gösterilmiştir. Bu değerler saat 09⁰⁰ da -5.99 ± 1.33 (n=12), 15⁰⁰ de 2.79 ± 3.41 (n=10), 21⁰⁰ de -3.81 ± 2.63 (n=10) ve 03⁰⁰ de -4.33 ± 3.21 (n=10) olarak bulunmuştur. Kronogramda görülen tepe (saat 15⁰⁰) ile çukur (saat 09⁰⁰) değeri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur (P<0.05).



Şekil 10a. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde melatonin (20 mg/kg)+nalokson (10 mg/kg) uygulamasıyla oluşan %MOA'nın günlü değişimi. ★ 21⁰⁰'den farklı (F=8.56, P<0.05)



Şekil 10b. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde melatoninin oluşturduğu etkiler üzerine naloksonun etkileri. ★ melatonin+nalokson 21⁰⁰'den farklı, ▲ melatonin+nalokson 15⁰⁰'den farklı, ● melatonin+nalokson 03⁰⁰'den farklı (F=18.66, P<0.0001).

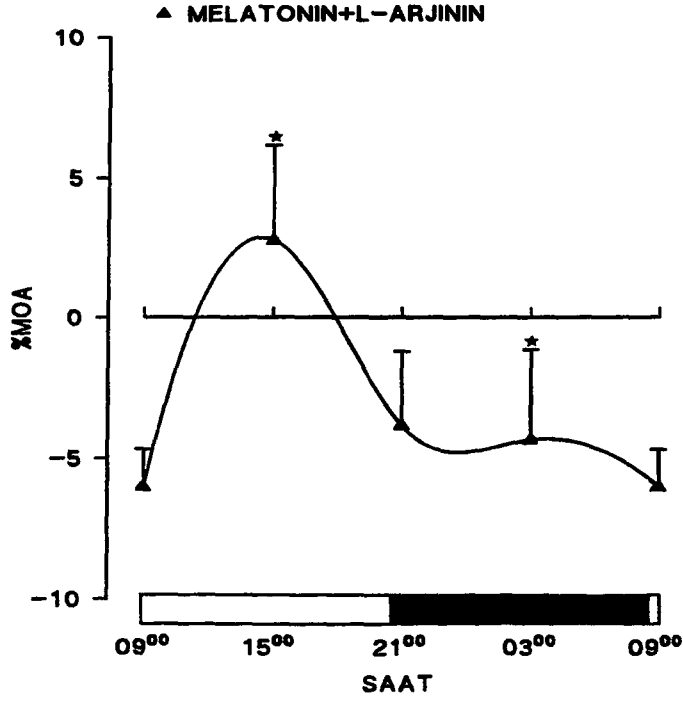
Hayvanlar 12:12 (aydınlık:karanlık) periyodunda bekletilmiştir. Siyah barlar karanlık

b) Melatonin+L-Arjinin Kombinasyonunun Etkileri ile Tek Başlarına L-Arjinin ve Melatoninin Etkilerinin Karşılaştırılması:

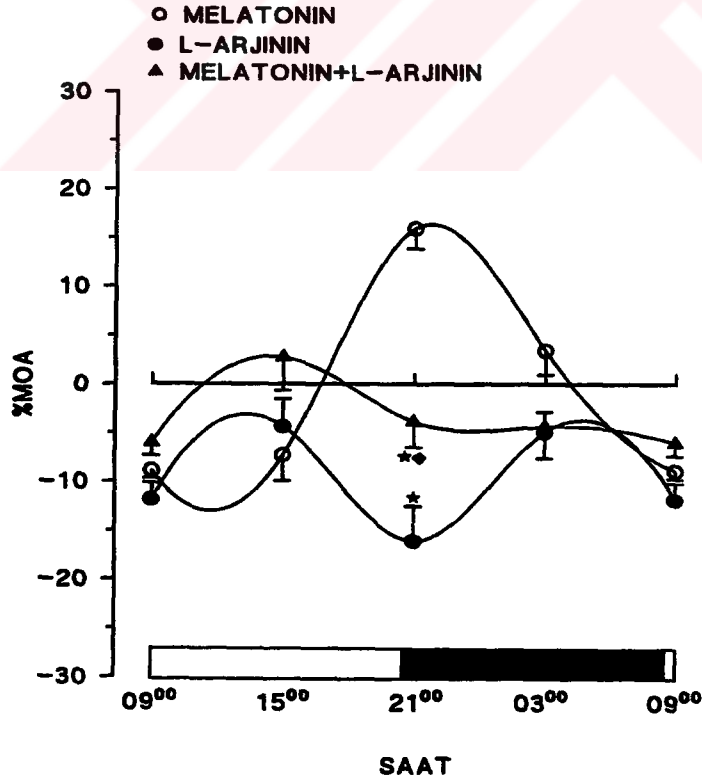
Her üç grubun oluşturdukları % MOA değerleri arasında yapılan anlamlılık testlerinde şu sonuçlar bulunmuştur (şekil 11b):

- **Saat 09⁰⁰**: Melatonin ve kombinasyon % MOA değerlerinin çukur oluşturduğu zaman dilimi saat 09⁰⁰ dur. Bu saatte melatonin ve L-arjininin etkisinde birlikte kullanıldıklarında istatistiksel anlamlı bir değişiklik meydana gelmemektedir ($P>0.05$).
- **Saat 15⁰⁰**: L-arjinin ve kombinasyonun % MOA değeri saat 15⁰⁰ de tepe oluşturmaktadır. Melatonin ve L-arjinin birlikte kullanıldıklarında etkilerinde anlamlı bir değişiklik oluşmamıştır ($P>0.05$).
- **Saat 21⁰⁰**: Melatonin % MOA değerinin tepe, L-arjinin % MOA değerinin çukur oluşturduğu zaman dilimi saat 21⁰⁰ dir. Bu saatte L-arjininle birlikte kullanılan melatoninin antinosiseptif etkisi nosisepsiyona dönüşmüştür ($P<0.05$).
- **Saat 03⁰⁰**: Bu saatte melatonin ve L-arjininin etkilerinde birlikte kullanıldıklarında anlamlı bir farklılık meydana gelmemiştir ($P>0.05$).

Bu sonuçlar, melatonin ile L-arjininle birlikte kullanıldığında melatoninin saat 21⁰⁰ etkilerinin ve ritmisitesinin değiştiğini göstermektedir.



Şekil 11a. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde melatonin (20 mg/kg)+L-arginin (2 mg/kg) uygulamasıyla oluşan %MOA'nın günüçi değişimi. ★ 09⁰⁰'dan farklı ($t=2.4$, $P<0.05$)



Şekil 11b. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde melatoninin oluşturduğu etkiler üzerine L-arginin etkileri. ★ melatoninin 21⁰⁰'den farklı, ◆ L-argininin 21⁰⁰'den farklı ($F=11.571$, $P<0.0001$).

Hayvanlar 12:12 (aydınlık:karanlık) periyodunda bekletilmiştir. Siyah barlar karanlık periyodunu göstermektedir.

IV.2.5. Melatonin ile Oluşturulan Antinosiseptif Etkide MM'nin Rolü

a) Melatonin+MM Kombinasyonunun Etkileri:

Melatoninin oluşturduğu etkisi profiline MM'nin katkısını araştırmak için bir grup fareye sıcak-plak uygulamasından önce melatonin (30 dakika, 20 mg/kg, i.p.)+MM (15 dakika, 40 mg/kg, i.p.) kombinasyonu uygulanmıştır. % MOA değerleri şekil 12a'da gösterilmiştir. Bu değerler saat 09⁰⁰ da -7.07 ± 1 (n=10), 15⁰⁰ de 3.14 ± 3.94 (n=10), 21⁰⁰ de -22.7 ± 2.65 (n=10) ve 03⁰⁰ de $-13 \pm 3,38$ (n=10) olarak bulunmuştur. Kronogramda görülen tepe (saat 21⁰⁰) ile çukur (saat 03⁰⁰) değeri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur (P<0.05).

b) Melatonin+MM Kombinasyonunun Etkileri ile Tek Başlarına MM ve Melatoninin Etkilerinin Karşılaştırılması:

Her üç grubun oluşturdukları % MOA değerleri arasında yapılan anlamlılık testlerinde şu sonuçlar bulunmuştur (şekil 12b):

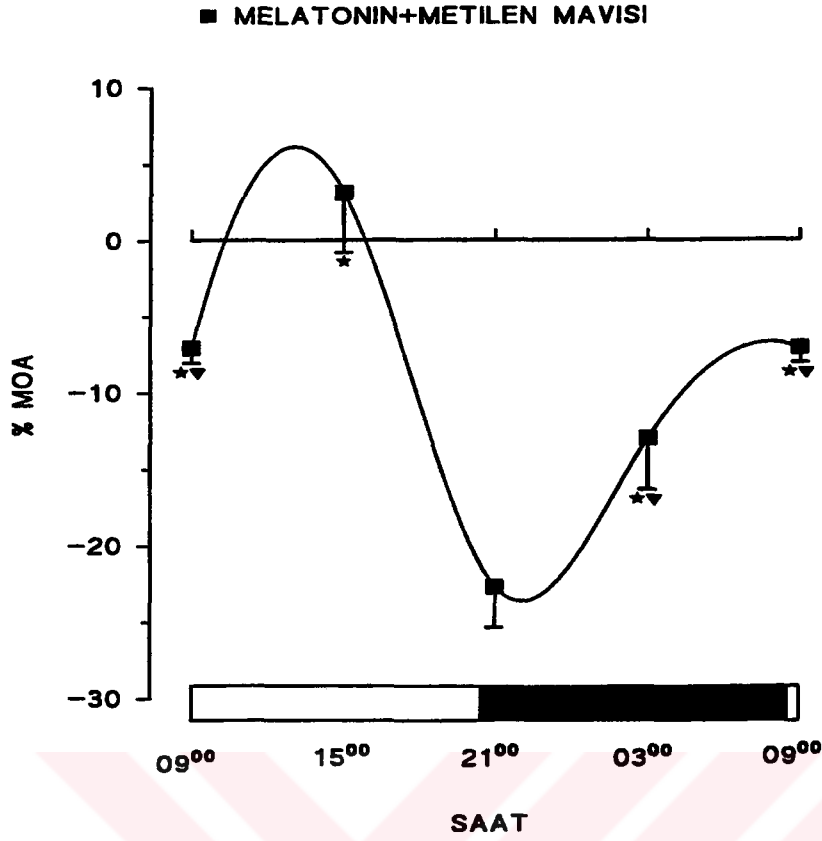
- Saat 09⁰⁰: Melatonin ve MM'nin % MOA değerlerinin çukur oluşturduğu zaman dilimi saat 09⁰⁰ dur. Bu saate birlikte kullanıldıklarında melatonin ve MM'nin etkilerinde anlamlı bir farklılık oluşmamıştır (P>0.05).

- Saat 15⁰⁰: Kombinasyonun % MOA değeri saat 15⁰⁰de tepe oluşturmaktadır. Kombinasyon melatoninin nosiseptif etkisini anlamlı olarak antinosisepsiyona çevirmiştir. MMnin antinosiseptif etkisi ise bu kombinasyonla istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (P<0.05).

- **Saat 21⁰⁰**: Melatonin tek başına % MOA değerinin tepe, kombinasyonun % MOA değerinin çukur oluşturduğu zaman dilimi saat 21⁰⁰ dir. Bu saatte melatonin ve MM birlikte kullanıldığında melatonin ve MM'nin oluşturduğu antinosiseptif etki nosisepsiyona çevrilmiştir (P<0.05).

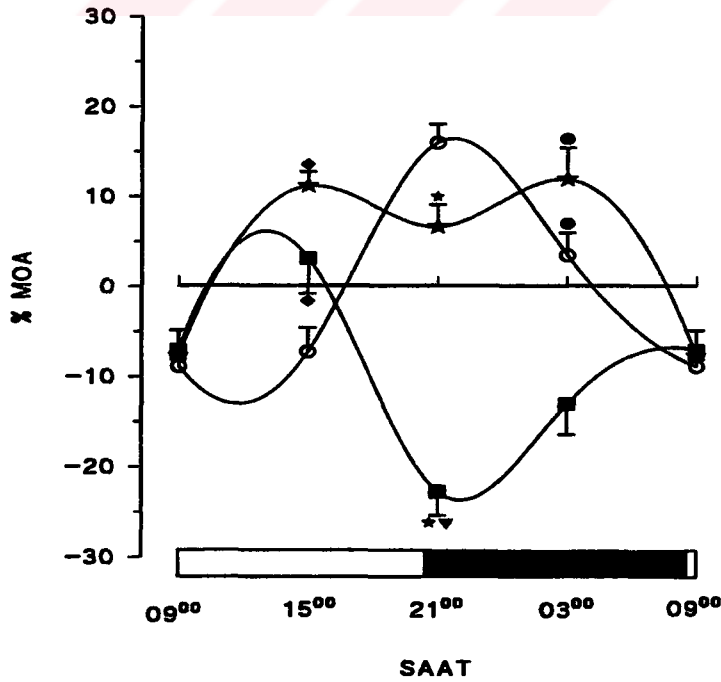
- **Saat 03⁰⁰**: MM'nin tepe değeri oluşturduğu zaman dilimi saat 03⁰⁰ tür. Bu saatte yine kombinasyon melatonin ve MM'nin antinosiseptif etkisini, nosiseptif etkiye çevirmiştir (P<0.05).

Bu sonuçlar, melatonin ile MM'nin birlikte kullanılmasının melatoninin etkilerini ve günüçi ritmisitesini değiştirdiğini göstermektedir.



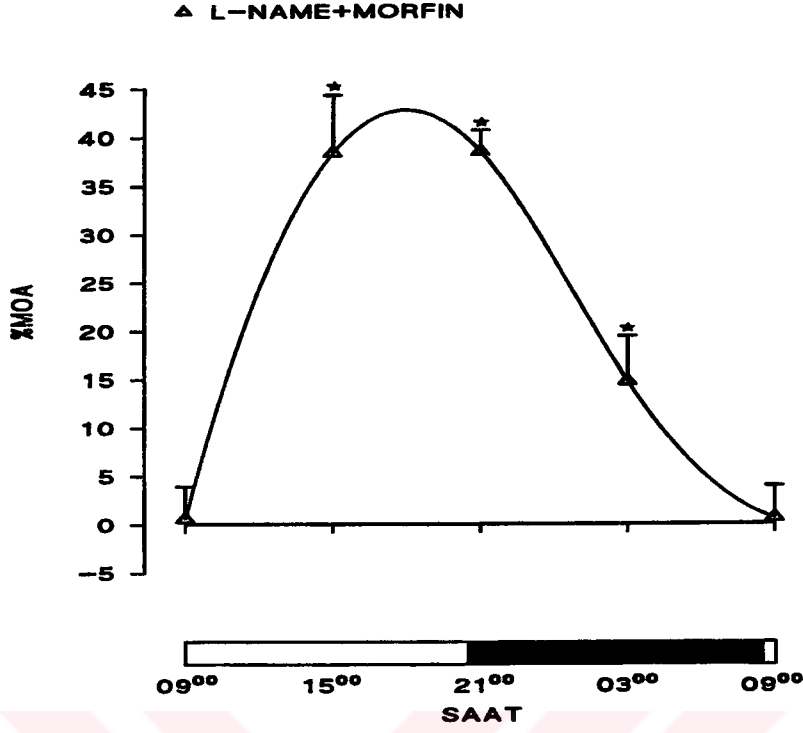
Şekil 12a. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde melatonin (20 mg/kg)+MM (40 mg/kg) uygulamasıyla oluşan %MOA'nın günüçi değişimi. ★ 21⁰⁰'den farklı, ▼ 15⁰⁰'den farklı (F=13.4, P<0.05)

- MELATONIN
- ★ METİLEN MAVISI
- MELATONIN+METİLEN MAVISI

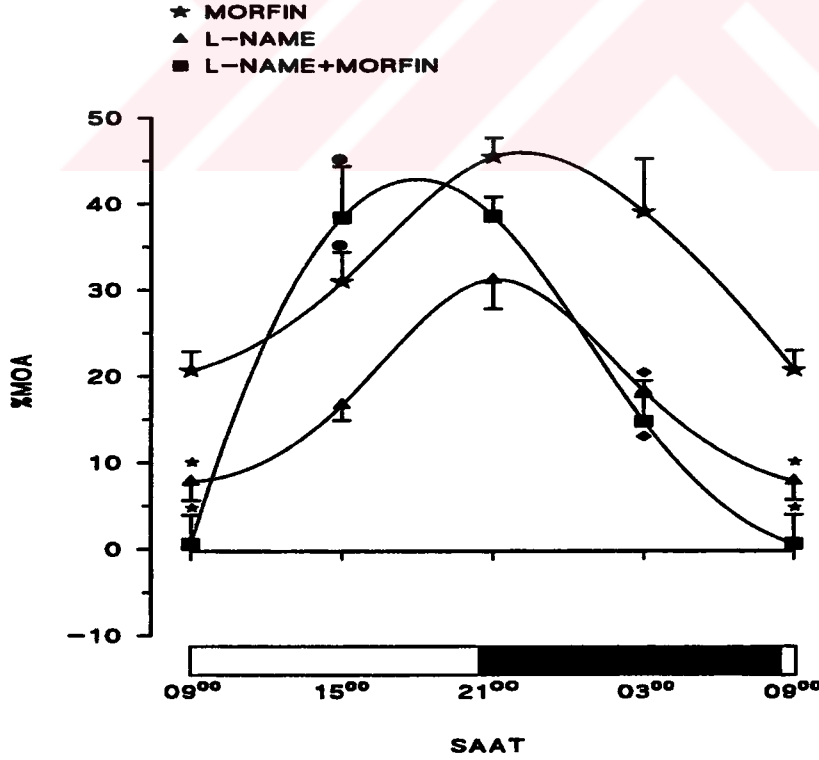


Şekil 12b. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde melatoninin oluşturduğu etkiler üzerine MM'nin etkileri. ★ melatoninin 21⁰⁰'den farklı, ◆ melatoninin 15⁰⁰'den farklı, ● melatonin+MM 03⁰⁰'den farklı, ▼ MM 21⁰⁰'den farklı (F=20.44, P<0.0001).

Hayvanlar 12:12 (aydınlık:karanlık) periyodunda bekletilmiştir. Siyah barlar karanlık periyodunu göstermektedir.



Şekil 13a. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde morfin (10 mg/kg)+L-NAME (40 mg/kg) uygulamasıyla oluşan %MOA'nın günüçi değişimi. ★ 09⁰⁰'den farklı (F=18.876, P=0.0001)



Şekil 13b. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde morfinin oluşturduğu etkiler üzerine L-NAME'in etkileri. ★ morfin 09⁰⁰'den farklı, ◆ morfin 03⁰⁰'den farklı, ● L-NAME 15⁰⁰'den farklı (F=15.37, P<0.05).

Hayvanlar 12:12 (aydınlık:karanlık) periyodunda bekletilmiştir. Siyah barlar karanlık periyodunu göstermektedir.

IV.2.6. Morfin ile Oluşturulan Antinosiseptif Etkiye L-NAME'in Etkileri

a) Morfin+L-NAME Kombinasyonunun Etkileri:

Morfinin oluşturduğu etkisi profilini L-NAME'in nasıl etkilediğini araştırmak için bir grup fareye sıcak-plak uygulamasından önce morfin (30 dakika, 10 mg/kg, i.p.)+L-NAME (60 dakika, 40 mg/kg, i.p.) kombinasyonu uygulanmıştır. % MOA değerleri şekil 13a'da gösterilmiştir. Bu değerler saat 09⁰⁰ da 0.58±3.36 (n=10), 15⁰⁰ de 38.34±5.96 (n=10), 21⁰⁰ de 38.48±2.24 (n=10) ve 03⁰⁰ de 14.7±4.7 (n=10) olarak bulunmuştur. Kronogramda görülen tepe (saat 21⁰⁰) ile çukur (saat 09⁰⁰) değeri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur (P<0.05).

b) Morfin +L-NAME Kombinasyonunun Etkileri ile Tek Başlarına Morfin ve L-NAME'in Etkilerinin Karşılaştırılması:

Her üç grubun oluşturdukları % MOA değerleri arasında yapılan anlamlılık testlerinde şu sonuçlar bulunmuştur (şekil 13b):

- Saat 09⁰⁰: L-NAME ve morfinin tek başlarına % MOA değerlerinin çukur değeri oluşturduğu zaman dilimi saat 09⁰⁰ dur. Bu saatte morfin L-NAME ile birlikte kullanıldığında morfinin tek başına gösterdiği % MOA etki istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (P<0.05).

- Saat 15⁰⁰: L-NAME'in bu saatte oluşturduğu antinosiseptif etki morfinle kombine edildiğinde anlamlı olarak potansiyalize olmuştur (P<0.05). Bu saatte morfinin etkisinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır (P>0.05).

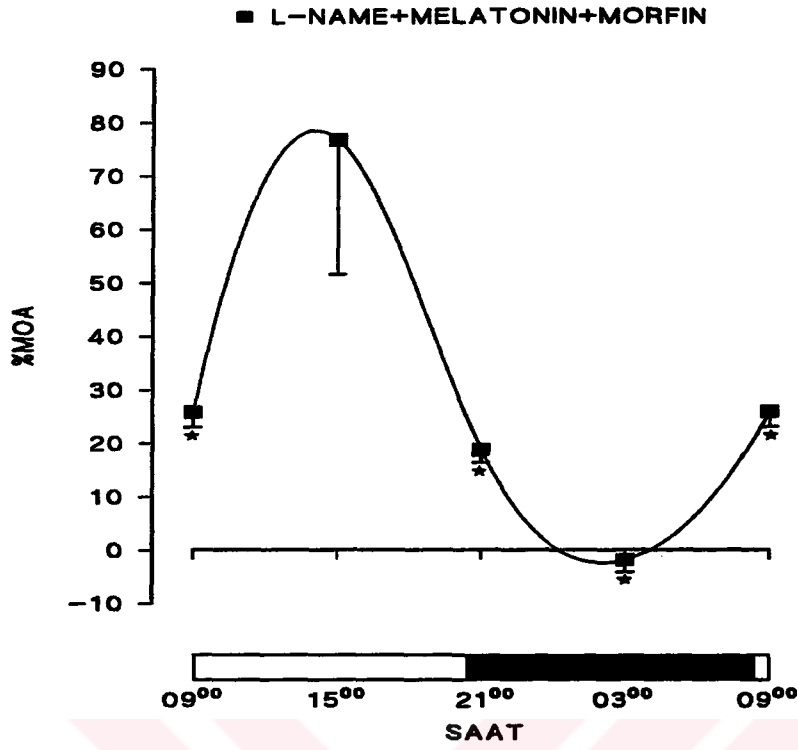
- **Saat 21⁰⁰**: Morfin ve L-NAME etkisinde birlikte kullanıldıklarında oluşturdukları antinosispetif etki ve tek başlarına oluşturdukları antinosispetif etki karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($P>0.05$).
- **Saat 03⁰⁰**: Morfinin oluşturduğu antinosispetif etki L-NAME ile kombine edildiğinde anlamlı olarak azalmıştır ($P<0.05$).

Bu sonuçlar, morfinin ile L-NAME kombine edildiğinde, L-NAME'in morfinin etkilerini değiştirdiğini ortaya koymaktadır.

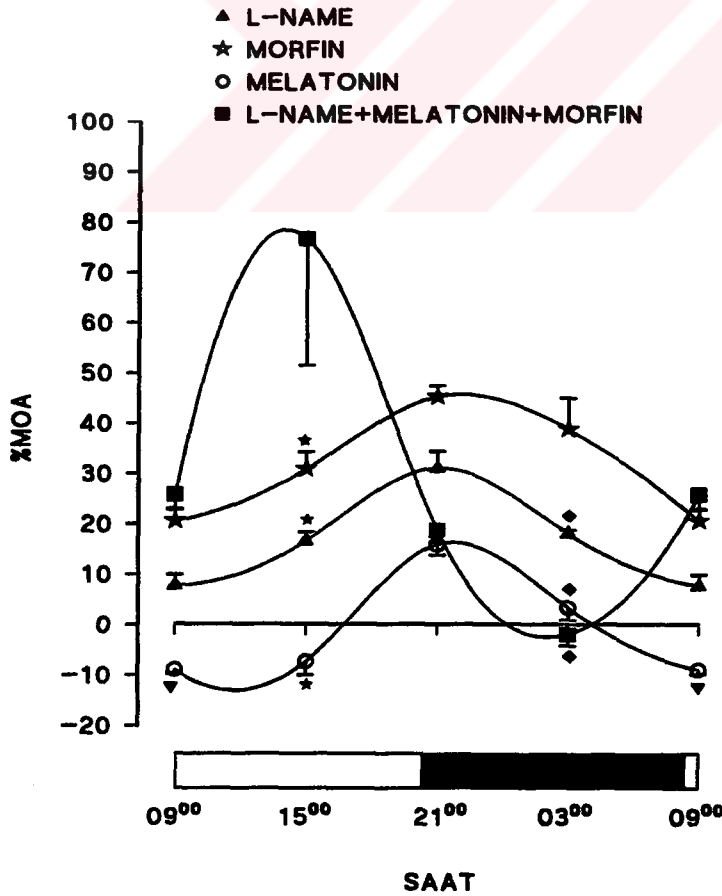
IV.2.7. Melatonin+Morfin+L-NAME Kombinasyonunun Etkileri

a) Kombinasyonunun Etkileri:

% MOA değerleri şekil 14a da gösterilmiştir. Bu değerler saat 09⁰⁰ da 25.89 ± 2.82 (n=10), 15⁰⁰ de 76.74 ± 25.19 (n=10), 21⁰⁰ de 18.82 ± 2.4 (n=10) ve 03⁰⁰ de -1.79 ± 2.3 (n=10) olarak bulunmuştur. Kronogramda görülen tepe (saat 15⁰⁰) ile çukur (saat 03⁰⁰) değeri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur ($P<0.05$).



Şekil 14a. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde Melatonin (20mg/kg)+morfin (10 mg/kg)+L-NAME (40 mg/kg) uygulaması ile oluşan etkilerin günüçi değişimi. ★15⁰⁰'den farklı (F=6.808, P=0.0009).



Şekil 14b. Farelerde sıcak-plak ağrı modelinde kombinasyonun etkilerinin morfin, L-NAME ve melatoninle karşılaştırılması. ★ kombinasyon 15⁰⁰'den farklı, ◆ morfin 03⁰⁰'den farklı, ▼ kombinasyon 09⁰⁰'den farklı (F=10.03, P<0.0001).

Hayvanlar 12:12 (aydınlık:karanlık) periyodunda bekletilmiştir. Siyah barlar karanlık periyodunu göstermektedir.

b) Melatonin+Morfin+L-NAME Kombinasyonunun Etkileri ile Tek Başlarına Morfin, Melatonin ve L-NAME'in Etkilerinin Karşılaştırılması:

Her üç grubun oluşturdukları % MOA değerleri arasında yapılan anlamlılık testlerinde şu sonuçlar bulunmuştur (şekil 14b):

- **Saat 09⁰⁰:** Melatonin ve morfinin tek başlarına % MOA değerlerinin çukur değeri oluşturduğu zaman dilimi saat 09⁰⁰ dur. Bu saatte melatonin morfin ile kombine edildiğinde melatoninin tek başına gösterdiği % MOA etki istatistiksel anlamlı olarak potansiyalize olmaktadır ($P<0.05$).
- **Saat 15⁰⁰:** Kombinasyonun % MOA değeri saat 15⁰⁰ de tepe değeri oluşturmaktadır. Bu saatte melatonin, morfin ve L-NAME birlikte kullanıldığında melatonin oluşturduğu nosiseptif etki antinosiseptif etkiye dönüşürken, L-NAME ve morfinin oluşturduğu antinosiseptif etki anlamlı olarak potansiyalize olmaktadır ($P<0.05$).
- **Saat 21⁰⁰:** Melatonin ve morfin tek başlarına % MOA değerlerinin tepe değeri oluşturduğu zaman dilimi saat 21⁰⁰ dir. Bu saatte melatonin, morfin ve L-NAME'in tek başına oluşturduğu % MOA etkideki potansiyalizasyon kombinasyon grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($P>0.05$).
- **Saat 03⁰⁰:** Kombinasyonun % MOA değeri saat 03⁰⁰ de çukur değeri oluşturmaktadır. Morfinin antinosiseptif etkisi melatonin ve L-NAME ile birlikte

kullanıldığında istetikel anlamlı olarak azalmıştır ($P<0.05$). L-NAME ve melatoninin etkisinde anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir ($P>0.05$).



V. TARTIŞMA

Bu çalışmada, sıcak-plak ağrı modeliyle melatoninin krononositif etkileri ve bu etkilerin NO ve opiyaterjik sistem ile ilişkisi araştırılmıştır.

Organizmada pek çok hücre, organ veya sistemlerde fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda ultradiyan, sirkadiyan veya infradiyan gibi zaman bağımlı değişikliklerin olduğu bilinmektedir. Ağrı ile ilgili çalışmalarda, sonuçların çeşitliliğinin minimize edilmesi için zaman bağımlı değişiklikler de göz önüne alınmalıdır^{57,63,105}.

Melatonin, pineal bez tarafından salgılanan, organizmanın sirkadiyan ritmik organizasyonunu kontrol eden bir nörohormondur¹²¹. İnsanlarda dahil, pek çok türde melatoninin sirküle eden serum düzeyleri, gündüz çok düşük^{13,158} gece ise yüksek¹⁰ sirkadiyan bir ritm gösterir. Bu da melatoninin gece daha fazla sentezlendiğinin bir göstergesidir¹²¹. Pineal bez ve melatonin ultradiyan (24 saatten kısa ritimler), infradiyan (24 saatten uzun ritimler), sirkannual (mevsimsel) ritimlerde gösterir¹²⁴.

Melatoninin analjezik etkisi daha önce yapılan çalışmalarda incelenmiştir. Golombek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada melatonin 20 mg/kg dozda saat 20⁰⁰ de maksimum antinosiseptif etki göstermiştir. Bu antinosiseptif etki nalokson varlığında bloke olmuştur⁵⁴. Opioid antagonist naloksonun pineal melatonin içeriğinin nokturnal artışını anlamlı olarak azaltması ve morfinin sıçan

pineal bezinde NAT aktivitesinde ve melatonin düzeylerinde artışa neden olması, ayrıca pineal bezde opioid reseptörlerin varlığı, pineal bezin opiyaterjik inervasyonu, melatoninin analjezik etki mekanizmasında opiyaterjik sistem ile ilişkisi olduğunu düşündürmektedir^{83,42,131,95,35,56}. Bu amaçla bu çalışmada da melatoninin analjezik etkisi üzerine morfin ve naloksonun etkilerini incelenmiştir. Golombek ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma ile uyumlu olarak melatoninin en etkin analjezik etkisinin 20 mg/kg olarak bulunması sonucunda deneylerde sadece bu doz kullanılarak melatoninin sıcak-plak üzerinde oluşturduğu etkilerin günüçi değişiklikleri incelenmiştir⁵⁴. Melatonin nosiseptif ve antinosiseptif olmak üzere dual etkilere sahip olduğu gözlemiştir. Pik değeri akşam 21⁰⁰ de, çukur değeri ise sabah saat 09⁰⁰ da oluşmuştur.

Morfin ve melatonin kombinasyonu ile gözlenen sirkadiyan ritmisite de melatoninin etki profili tepe ve çukur zamanları açısından değişmiştir. Pik değerin saat 15⁰⁰, çukur değerin ise 03⁰⁰ e kaydığı gözlenmiştir. Bu endojen melatonin düzeylerinde gündüz döneminde gözlenen konsantrasyon düşüklüğünü olurladığı gibi aynı dönemde melatonin reseptör duyarlılığının da azaldığını düşündürmektedir. Diğer yandan, morfin gerek tek başına analjezik aktive oluşturduğu gerekse melatoninle kombine edildiğinde melatoninin antinosiseptif etkisini anlamlı olarak potansiyalize ettiği gözlenmektedir. Bu sonuçlar aynı zamanda melatoninin analjezik aktivitesinde opiyaterjik sistemin katkı yaptığını bildiren diğer çalışmaları da teyid etmektedir. μ opioid reseptör antagonisti olan naloksonun parsiyel analjezik etkilerinin de bulunduğu bildirilmektedir⁶⁹. Bu tez çalışmasında da, nalokson tek başına antinosiseptif ve nosiseptif olmak üzere

dual etkiler oluşturmuştur. Melatoninle kombine edildiğinde melatoninin antinosiseptif etkisini anlamlı olarak tersine çevirmiştir. Bu sonuçlar, Golombek ve arkadaşlarının nalokson ve melatoninle elde ettikleri sonuçlarla uyumludur. Melatoninin antinosiseptif etki mekanizmasında opiyaterjik sistemin rolü olabileceği bu sonuçlarla desteklenmiştir.

NO, santral sinir sisteminde nöronlarda sentezlenir ağrı modülasyonu, nöronal aktivite ve kan akımı arasındaki koordinasyon hafıza formasyonu gibi birçok santral ve periferik fizyolojik fonksiyonda mediyatör olarak rol oynar. Beyin ve omurilikte NOS aracılığıyla oluşan NO, sGMP artışı sonucunda nosisepsiyonu indüklemektedir. Sıçan pineal bezinde yapılan bir çalışmada NOS aktivitesi incelenmiştir¹⁶. Pineal bezde Ca-kalmodulin bağımlı NOS'un varlığı gösterilmiştir. Ayrıca L-NAME'in pineal bezde tespit edilen NOS aktivitesini inhibe ettiği noradrenalinin ise aktive ettiği bulunmuştur⁸². Ayrıca melatoninin inflamatuvar proseslerde önemli koruyucu etkilere sahip olduğu bunu da NO üretimini inhibe edici ve serbest radikal süpürücü etkileriyle sağladığı gösterilmiştir^{121,112}.

Melatoninin NO ile etkileşimi ağrı ile ilgili çalışmalarda incelenmemiştir. Melatoninin antinosiseptif etki mekanizmasında NO'nun herhangi bir katkısının bulunup bulunmadığını araştırmak amacıyla L-arjinin, L-NAME ve MM'nin melatoninle kombine edildiklerinde oluşan etkiler incelenmiştir. NO prekürsörü olan L-arjininin nosiseptif proseslerde rolü vardır¹⁶. Bu etkiler nosisepsiyon ve antinosisepsiyon olmak üzere dualdır¹. Bu arada

laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda L-arjininin krononosisepsiyondaki etkileri etraflı olarak incelenmiştir¹⁴⁵. Bu tez çalışmasında kullanılan L-arjinin 2 mg/kg dozunda tek başına nosiseptif etkiler oluştururken melatoninle kombine edildiğinde melatoninin antinosiseptif etkisini anlamlı olarak inhibe etmiştir. L-arjinin bu tez kapsamında tek başına ve çalışılan tüm zaman aralıklarında oluşturduğu nosiseptif etki laboratuvarımızın daha önceki çalışmalarından farklılık göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda uygulanan L-arjinin dozları fare abdominal kıvrınma aljezi modelinde denenmiştir. Oysa bu kez L-arjinin dozu fare sıcak-plak aljezi modelinde denenmiştir. Sıcak-plak aljezi modeli supraspinal ağrı kalıbı oluşturan termal uyarı modeli olup, abdominal kıvrınma modelinden ağrı yolları bakımından farklılaşma göstermektedir. Bu çerçevede L-arjininin sadece nosiseptif etki kalıbı göstermesinin temel nedeni bu farklılığa bağlanabilir.

Supraspinal ağrı yollarında L-arjininle indüklenen NO'nun nosiseptif etki gösterdiği Takagi ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir⁶⁷. Bu çerçevede burada L-arjininin melatoninin antinosiseptif etkisini inhibe etmesi melatoninle NO arasında inflamatuvar proseslerin yanı sıra ağrı yollarında da bir etkileşme olduğunu ve bunun günüçi bir ritme bağlı geliştiğini telkin etmektedir.

NOS inhibitörü olan L-NAME'in yapılan önceki çalışmalarda gerek formalinle indüklenen pençe yalama, asetik asitle indüklenen abdominal konstriksiyon ve gerekse sıcak-plak testlerinde antinosiseptif etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir¹⁴³. Bu sonuçlara uygun olarak L-NAME'in gün içi ritim

gösteren antinosiseptif etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Melatoninle kombine edildiğinde, L-NAME'in melatoninin saat 21⁰⁰'de oluşturduğu antinosiseptif etkiyi tersine çevirdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, melatoninin antinosiseptif etkisinin L-arjinin/NO yolağında bir etkileşme oluşturduğunu düşündürmektedir. Ancak bu tez kapsamındaki bulgular bunun mekanizmasını açıklayabilme yeteneğinde değildir.

Ayrıca melatonin, L-NAME ve morfin kombinasyonunun sirkadiyan bir ritmisite göstermesine karşın melatoninin tek başına oluşturduğu etki profili tepe ve çukur zamanları bakımından değişmektedir. Melatonin, morfin ve L-NAME'in kombinasyon pik zamanı saat 15⁰⁰ e, çukur zamanı ise 03⁰⁰ e kaymıştır. Melatoninin etkisinin saat 15⁰⁰ de antinosisepsiyona çevrilmiş olduğu ve morfin ve L-NAME'in etkilerinin de anlamlı olarak potansiyalize olduğu bulunmuştur.

Morfin ve L-NAME kombinasyonunun oluşturduğu etkiler laboratuvarımızda daha önce yapılan bir çalışmada incelenmiş ve L-NAME'in morfinin antinosiseptif etkisini potansiyalize ettiği bulunmuştur⁵⁸. Bu tez çalışmasında bu çalışmada kullanılan morfin ve L-NAME dozları kullanılmıştır fakat elde edilen bulgular bu bulgulardan farklılık göstermektedir. L-NAME, morfinin antinosiseptif aktivitesini 09⁰⁰ ve 03⁰⁰ saatlerinde inhibe ettiği tespit edilmiştir.

MM guanilil siklaz inhibisyonunun yanı sıra NOS inhibisyonuda yapmaktadır^{143,147}. Vasküler dokuda bulunan guanilil siklaz aktivitesinin dışında,

sıçan pineal bezinde de bu enzim aktivitesi gösterilmiş, hem sitozolik ve hem de partiküllü izoformları için birisi aydınlık fazın ortasında diğeri ise karanlık fazın ortasında iki pik içeren 24 saatlik ritim bildirilmiştir. Çalışmanın devamında yapılan deneylerde sitozolik guanilil siklaz aktivitesi NOS inhibitörü L-NMMA ile değişmediğinden dolayı enzim aktivitesinde görülen ritimlerin bir guanilil siklaz stimülatörü olan NO düzeylerini yansıtmadığı yorumu yapılmıştır¹⁹⁴. Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda, farelerde p-benzokinon ile indüklenen aljezi modelinde MM'nin doz bağımlı (5-160 mg/kg) olarak antinosiseptif ve nosiseptif etkilerinin olduğu zaman bağımsız olarak gösterilmiştir³. Antinosisepsiyon, 40 mg/kg düzeyi hariç diğer dozlarda ortaya çıkmıştır. Yine laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmada p-benzokinon ile indüklenen aljezi modelinde MM'nin 40 mg/kg dozda günüçi oluşturduğu etkiler incelenmiştir. MM çalışılan tüm zaman noktalarında sirkadiyan antinosiseptif bir aktivite kalıbı sergilemiştir¹⁴⁵. Bu çalışmada ise kullanılan 40 mg/kg dozda MM'nin antinosiseptif ve nosiseptif olmak üzere dual etkiler oluşturduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra MM, melatoninin antinosiseptif etkisini inhibe etmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları melatoninin sıcak-plak ağrı modelinde nosiseptif ve antinosiseptif olmak üzere dual etkiler oluşturduğunu ve bu etkilerin günüçi bir ritime sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca melatoninin sıcak-plak ağrı modelinde oluşturduğu etkilerin opiyaterjik sistem ve L-arjinin/NO yolağı ile ilişkisi olabileceğini ileri sürmektedir.

VI. ÖZET

Melatonin, pineal bez tarafından salgılanan ve organizmanın sirkadiyan ritmik organizasyonunu kontrol eden bir hormondur. Nitrik oksit sentaz enzimiyle L-Arjininden üretilen nitrik oksidin (NO) ağrı modellerinde santral ve periferel dual etkileri vardır. Yapılan invitro çalışmalar melatoninin NO üretimini inhibe ettiğini göstermiştir. Bu çalışmanın amacı, hot-plate ağrı modeliyle melatoninin krononosisieptif etkilerini ve bu etkilerin NO ve opioid sistem ile ilişkisini araştırmaktır. Deneyler günün dört farklı saatinde (09⁰⁰, 15⁰⁰, 21⁰⁰, 03⁰⁰), 12:12 (aydınlık-karanlık) periyodundaki erkek fareler kullanılarak yapılmıştır. Melatonin saat 21⁰⁰ de 5, 10, 20 ve 40 mg/kg dozlarda hot-plate testinden 30 dakika önce uygulanmış ve maksimum etkiyi 20 mg/kg dozda göstermiştir. Hayvanlara serum fizyolojik, melatonin (20 mg/kg), morfin (10 mg/kg) ve nalokson (10 mg/kg) hot-plate testinden 30 dakika önce, MM (40 mg/kg) ve L-arjinin (2 mg/kg) 15 dakika önce, L-NAME (40 mg/kg) ise 60 dakika önce intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Sonuçlar, %Maksimum Olası Analjezi olarak belirtilmiş ve ANOVA ve Student's t testi ile değerlendirilmiştir. Melatonin, morfin, nalokson, L-arjinin, MM ve L-NAME yapılan testlerde anlamlı olarak sirkadiyan ritmisite göstermiştir. Melatonin aljezik ve analjezik etkiler oluştururken, pik saat 21⁰⁰ de çukur ise saat 09⁰⁰ da meydana gelmiştir. Melatoninin analjezik etkisi, L-NAME, nalokson ve L-arjinin uygulamasıyla saat 21⁰⁰ de tersine dönmüştür. Morfin, melatoninin etkisini saat 15⁰⁰ de anlamlı olarak artırmıştır. L-NAME, morfin analjezisini saat 09⁰⁰ da anlamlı olarak azaltmıştır. MM, saat 15⁰⁰ de melatoninin aljezik etkisini, saat 21⁰⁰ ve 03⁰⁰ de ise analjezik

etkisini tersine çevirmiştir. Bu sonuçlar, melatoninin analjezik etki mekanizmasında opioid sistem ve /L-Arjinin/NO yolağının rolü olabileceğini düşündürmektedir.



VII. SUMMARY

Melatonin is a hormone produced by the pineal gland. It is produced and secreted on a 24-hour rhythm depending on environmental light. Nitric oxide (NO) is produced from L-Arginine by nitric oxide synthase (NOS) and has dual effects on nociceptive patterns acting by centrally and peripherally. Melatonin is an inhibitor of NO production and has free radical scavenger activity. The aim of this study was to investigate the chronorhythmic pattern of melatonin-induced nociception in hot-plate mice model with the interaction of opioidergic system and L-Arginine/NO pathway. Experiments were performed in mice synchronised to 12:12 LD (lights on at 09⁰⁰) at four different times of day (09⁰⁰, 15⁰⁰, 21⁰⁰, 03⁰⁰). Melatonin, morphine, naloxone, L-arginine, methylene blue and L-NAME possessed significant circadian rhythmicity on hot-plate induced algesia. Melatonin exhibited analgesic and algesic effects with a peak at 21⁰⁰ and a trough at 09⁰⁰ respectively. The analgesic activity of melatonin was reversed by L-NAME, naloxone, methylene blue and L-arginine administration. Morphine potentiated the analgesic effect of melatonin. L-NAME reduced morphine analgesia at 09⁰⁰. These results indicate that time dependent melatonin analgesia is sensitive to opioidergic system and L-Arginine/ NO pathway.

VIII. KAYNAKLAR

1. ABACIOĞLU, N., ZENGİL, H., ULUDAĞ, O., TUNÇTAN, B. AND GÜNEY, Z.: Chronorhythmicity of L-arginine in Nociception With the Interaction of H1-receptor Blocker Mepyramine. *Chronobiol. Int.* 14 (suppl) (2) (Abstract) (1997).
2. ABRAM, S.E.: Pain Pathways and Mechanisms. In: *The Pain Clinical Manual*. J.P. Lippincott Company, Philadelphia, pp: 23-29. (1990)
3. AKBULUT, E.: Piridoksinin Antinosisseptif Etkisinde Nitrik Oksidin Rolü. Yüksek Lisans tezi, Gazi Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara (1996).
4. ALEXANDER, S.P.H., PETERS, J.A.: Receptor and ion channel nomenclature supplement. *TiPS*. (1998)
5. ALMAY, B.G.L., VON KNORRING, L., WETTERBERG, L.: Melatonin in Serum and Urine in Patients with Idiopathic Pain Syndromes. *Psychiatry Res.* 22:179-191. (1987)
6. ALOYO, V. J., BATTISI, W. P., PAZDALSKI, P. S.: Characterization and Localization of Delta Opioid Binding Sites in the Bovine Pineal. *J. Pineal Res.*, 15:108-114. (1993)
7. ALOYO, V. J.: Identification and Characterization of Delta Opioid Binding Sites in the Bovine Pineal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 262:292-297. (1992)

8. ALPHS, L., HELLER, A., LOVENBERG, W.: Adrenergic regulation of the reduction in acetyl coenzyme A: arylamine N-acetyltransferase activity in the rat pineal, *J. Neurochem.*, 34, 83-90. (1980)
9. ARANGINO, S., CAGNACCI, A., ANGIOLUCCI, M., VACCA, A. M. B., LONGU, G., VOLPE, A., MELIS, G. B.: Effects of melatonin on vascular reactivity, catecholamine levels, and blood pressure in healthy men, *Am. J. Cardiol.*, 83, 1417-1419. (1999)
10. ARATO, M., GROF E., GROF P., LASZLO I., BROW G.M.: Reproducibility of the overnight melatonin secretion pattern in healthy men. In: *Advances in the Biosciences: The Pineal Gland: Endocrine Aspects*. G.M. Brown, S.D. Wainwright, eds. Pergamon Press, Oxford, pp. 277-282. (1985)
11. ARENDT, J.: The Pineal Gland, Circadian Rhythms and Photoperiodism: Physiology and Pharmacology of Biological Rhythms. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Redfern, P.H., Lemmer, B. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin 125, pp: 375-414. (1997)
12. ASCHOFF, J., FATRANSKA, M., GIEDKE, H., DOERR, P., STAMM, D., WISSER, H.: Human Circadian Rhythms in Continuous Darkness. Entrainment by Social Cues. *Science* 171, 213-215. (1971)
13. AXELROD, J.: The Pineal Gland: A Neurochemical Transducer. *Science* 184:1341-1348. (1974)

14. BARNES, P.J.: Autonomic Control of the Airways and Nocturnal Asthma as a Basis for Drug Treatment. In: Chronopharmacology, Cellular and Biochemical Interactions (Ed. Lemmer, B) Marcel Dekker Inc, New York, pp: 53-63. (1989)
15. BASBAUM, A.I., LEVINE, J.D.: Opiate Analgesia-How Central is a Peripheral Target. *New Engl. J. Med*, 325 (16), 1168-1169. (1991)
16. BEIRITH, A., CRECZYNSKI-PASA, T.B., BONETTI, V.R., KONZEN, M., SEIFRIZ, I., PAULA, M.S., FRANCO, C.V., CALIXTO, J.B.: Antinociceptive properties and nitric oxide synthases inhibitory action of new ruthenium complexes. *Eur. J. Pharmacol.* 369: 289-297. (1999)
17. BELLAMY, N., SOTHERN, R. B. and CAMPELL, J.: Rhythmic Variations in Pain Perception in Osteoarthritis of the Knee. *J. Rheumatol.* 17: 364-372. (1990)
18. BENBEHANI, M.: Physiology of Pain. In: *Practical Management of Pain.* Year Book Medical Publishers INC, First Edition, Ed by Raj, PP. Chicago pp: 61-77. (1986)
19. BERNARD, M., IUVONE, P.M., CASSONE, V.M., ROSEBOOM, P.H., COON, S.L. AND KLEIN, D.C.: Avian melatonin synthesis: Phatic and circadian regulation of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the chicken pineal gland and retina, *J. Neurochem.*, 68, 213-224. (1997)

20. BETTAHI, I., POZO, D., OSUNA, C., REITER, R. J., ACUNA-CASTROVIEJO, D., GUERRERO, J. M.: Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus, *J. Pineal Res.*, 12, 313-323. (1989)
21. BOJKOWSKI, C., ALDHOUS, M., ENGLISH, J., et al.: Suppression of nocturnal plasma melatonin and 6-sulphatoxymelatonin by bright and dim light in man. *Horm. Metab. Res.*, 19: 437-440. (1987)
22. BROWN, E. N., CHOE, Y., SHANAHAN, T. L., CZEISLER, C. A.: A mathematical model of diurnal variations in human plasma melatonin levels, *Am. J. Physiol.*, 272, E506-E516. (1997)
23. BRUERA, E., MACMILLAN, K., KUEHN, N., MILLER, M.J.: Circadian Distribution of Extra Doses of Narcotic Analgesics in Patients with Cancer Pain: A Preliminary Report. *Pain*, 49:311-314. (1992)
24. BRUMMER, P.D., METZGER, G., LEVI, F.: Pharmacologic restoration of suppressed temperature rhythms in rats by melatonin, melatonin receptor agonist, S20242, or 8-OH-DPAT. *Eur. J. Pharmacol.* 347, 57-66. (1998)
25. BUBENIK, G. A., BLASK, D. E., BROWN, G. M., MAESTRONI, G. J., PANG, S. F., REITER, R. J., VISWANATHAN, M., ZISAPEL, N., Prospects of the clinical utilization of melatonin, *Biol. Signals Recept.*, 7(4):195-219. (1998)
26. CAGNOCI, A., ARANGINO, S., ANGILOUCCI, M., MASCHIO, E. LANGU, G., AND MELIS, G.B.: Potentially beneficial cardiovascular effects of melatonin administration in women, *J. Pineal. Res.*, 22: 16-19. (1997)

27. CAGNOLI, C. M., ATABAY, C., KHARLAMOVA, E., MANEV, H.: Melatonin protects neurons from singlet oxigen-induced apoptosis, *J. Pineal Res.*, 18, 222-226. (1995)
28. CARANDATE, F., HALBERG, F.: Chronobiology in Blood Pressure. in 1985. *Chronobiologia* 11, 189-310. (1984)
29. CASSONE, V. M.: Melatonin: Time in a bottle, *Oxford Rev Reprod Biol.*, 12, 319-367. (1990)
30. CASSONE, V.M. AND NATESAN, A.K.: Time and Time Again: The Phylogeny of Melatonin as a Transducer of Biological Time, *J. Biol. Rhythms*, 12(6), 489-497. (1997)
31. CERVERO, F.: Neurophysiology Aspects of Pain and Pain Therapy. In: *The Therapy of Pain*, First Edition, Ed by Sherdlow, M. MTP Press Limited, London, pp 1-30. (1986)
32. CHERDCHU, C., LT, W, HEXUM, T.D., EBADI, M.: [Met5]-Enkephalin-like Immunoreactivity in the Bovine Pineal Gland. *Neuroendocrinol. Lett.* 11:69-74. (1989)
33. CLOSS, S.J: An Exploring Analysis of Nurses Provision of Postoperative Analgesic Drugs. *J. Adv. Nursing*, 15:42-47. (1990)

34. COSTANTINO, G., CUZZOCREA, S., MAZZON, E., CAPUTI, A.P.: Protective Effect of Melatonin in Zymosan-Activated Plasma-Induced Paw Inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 363: 57-63, (1998)
35. COTO-MONTES, A., MASSON-PEVET, M., PEVET, P., MOLLER, M.: The Presence of Opioidergic Pinealocytes in the Pineal Gland of the European hamster (*Cricetus cricetus*): An immunocytochemical study. *Cell Tiss. Res* 278:483-491. (1994)
36. COWEN, P.J., FRASER, S., SAMMONS, R., GREEN, A.R.: Atenolol reduces plasma melatonin concentration in man, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 15, 579-81. (1983)
37. CUZZOCREA, S., ZINGARELLI, B., COSTANTINO, G., CAPUTI, A.P.: Protective Effect of Melatonin in a Non Septic Shock Model Induced by Zymosan in the Rat. *J. Pineal. Res.* 25: 24-33. (1998)
38. CUZZOCREA, S., ZINGARELLI, B., GILARD, E., HAKE, P., SALZMAN, A. L., SZABO, C.: Protective Effect of Melatonin in Carrageenan-Induced Models of Local Inflammation. *J. Pineal. Res.* 23: 106-116. (1997)
39. DIJK, D. J., CAJOCHEN, C.: Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG, *J. Biol. Rhythms*, 12(6):627-635. (1997)
40. DUBNER, R.: Methods of Assessing Pain in Animals. In: *Textbook of Pain* (Ed. by Wall, P.D. and Melzack, R.) Churchill Livingstone 247-255. (1989)

41. EBADI, M., GOVITRAPONG, P., PHANSUWAN-PUJITO, P., NELSON, F., REITHER, R.J.: Pineal Opioid Receptors and Analgesic Action of Melatonin. *J. Pineal Res.* 24:193-200. (1998)
42. ESPOTI, D., ESPOTI, G., LISSONI, P., PARRAVICINT, L., FRASCHINI, F.: Action of Morphine on Melatonin Release in the Rat. *J. Pineal Res.*, 5:35-39. (1988)
43. FEELISCH, M., and STAMLER, J. S.: Donors of Nitrogen Oxides. In: *Methodes in Nitric Oxide Research*, ed by M. Feelisch and J.S. Stamler, pp. 71-115, Wiley and Sons Ltd., New York. (1996)
44. FELDMAN, P.L., P.L., GRÍFFÍTH, O.W., STUEHR, D.J.: The Surprising Life of Nitric Oxide. *C.&EN.* December 20, 26-38. (1993)
45. FÖRSTERMANN, U., CLOSS, E.I., POLLOCK, J.S., NAKANE, M., SCHWARZ, P., GATH, I., KLEINERT, H.: Nitric Oxide Synthase Isozymes. *Characterization, Purification, Molecular Cloning, and Functions. Hypertension* 23 (Pt. 2), 1121-1131. (1994)
46. FRASCHINI, F., ESPOTI, D., ESPOTI G., LISSONI, P., LUCINI, V., CATTANEO, G.: Clinical and experimental data on the relationships between pineal endocrine function and the opioid system. *Adv. Pineal Res.* 2:171-180. (1987)
47. FRASCHINI, F., ESPOTI, D., ESPOTI G., LUCINI, V., MARIANI, M., SCAGLIONE, F., VIGNATI, G., DELLA BELLA, D.: On a Possible Role of

Endogenous Peptides on Melatonin Secretion. *Adv. Pineal Res.*, 3:127-132.

(1989)

48. FREDERICSON, R.C.A., BURGIS, V. and EDWARDS, J.D.:
Hyperalgesia Induced by Naloxone Follows A Diurnal Rhythm in Responsivity to
Painful Stimuli. *Science* 198, 756-758. (1977)

49. FURCHGOTT, R.F.: The Role of Endothelium in the Responses of
Vascular Smooth Muscle to Drugs. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24, 175-197.
(1984)

50. GEFFERD, M., GAFFORI, O., CHAVEAU, J. MUYARD, J. P.,
LEMOAL, M.: Dramatic Increase in Pineal Gland Melatonin Levels in the Rat
After Subcutaneous Injection of Des-Tyrosine Gamma Endorphin. *Neurosci. Lett.*
27:329-334. (1981)

51. GELLER, D.A., BILLIAR, T.R.: Should Surgeons Clone Genes? The
Strategy behind the Cloning of the Human Inducible Nitric Oxide Synthase Gene.
Arch. Surg. 128, 1212-1220. (1993)

52. GILAD, E., CUZZOCREA, S., ZINGARELLI, B., SALZMAN, A.L.,
SZABO, C.: Melatonin is a scavenger of peroxinitrite. *Life Sci.*, 60:PL169-
PL174. (1997)

53. GOBEL, H. and CORDES, P.: Circadian Variation of Pain Sensitivity in
Pericranial Musculature. *Headche* 30, 418-422. (1990)

54. GOLOMBEK, D.A., ESCOLAR, E., BURIN, L.J., DE BRITO SANCHEZ, M.G., CARDINALI, D.P.: Time-Dependent Melatonin Analgesia in Mice: Inhibition by Opiate or Benzodiazepine Antagonism. *Eur. J. Pharmacol.* 194:25-30. (1991)
55. GOVITRAPONG, P., JITAJAMJANG, W., PHANSUWAN PUJITO, P., EBADI, M.: Existence and Function of Opioid Receptors on Mammalian Pinealocytes. *J. Pineal. Res.* 24(4): 201-8. (1998)
56. GOVITRAPONG, P., PARIYANONTH, M., EBADI, M.: The Presence and Actions of Opioid Receptors in Bovine Pineal Gland, *J. Pineal Res.* 13:124-132. (1992)
57. GRABFIELD, G.P. and MARTIN, E.G.: Variations in the Sensory Threshold for Faradic Stimulation in Normal Human Subjects. I. The Diurnal Rhythm. *Am. J. Physiol.* 31, 300-308. (1912)
58. GÜNEY, H.Z, GÖRGÜN, C.Z., TUNÇTAN, B., ULUDAĞ, O., HODOĞLUGİL, U., ABACIOĞLU, N. AND ZENGİL, H.: Circadian-rhythm-dependent effects of L-N^G-Nitroarginine methyl ester (L-NAME) on morphine-induced analgesia. *Chronobiol. Internat.* 15(3), 283-289. (1998)
59. HANSSSEN, T., HEYDEN, T., SUNDBERG, I, ALFREDSSON, G., NYBÄCK, H., WETTERBERG, L.: Propranolol in schizophrenia. Clinical, metabolic and pharmacological findings, *Arch. Gen. Psychiatry*, 37, 685-90. (1980)

60. HARTHE, C., CLAUSTRAT, B., BRUN, J., CHAZOT, G.: Direct radioimmunoassay of 6-sulfatoxymelatonin in plasma with use of an iodinated tracer, *Clin. Chem.*, 37:4, 536-539. (1991)
61. HAUS, E., TOUTOU, Y.: **Principals of Clinical Chronobiology: In: Biological Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine. Second edition, (Ed. Touitou Y., Haus, E.) Springer-Verlag, Berlin pp: 6-34. (1994)**
62. HUETHER, G., POEGGELER, B., REIMER, A., AND GEORGE, A.: Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: Evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract, *Life Sci.*, 51:945-853. (1992)
63. HUMMEL, T., HEPPEL, M., KASIER, R., BOS, R., LIEFJOLD, J. and KOBAL, G.: Investigation of Circadian Effects on the plasma Levels of Dyhydrocodeine and Tramadol After Peroral Administration. In: *Proceedings of the 5th International Conference on Biological Rhythms and Medications, Amelia Island, F.L, Smolensky, M.h., Labrecque, g., Reinberg, a. and Haus, E. (Eds.) Houston p. xiii-4. (1992)*
64. IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRN, S., CHAUAHURI, G.: Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF) Produced and Released from Artery, Vein is Nitric Oxide. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 84, 9265-9269. (1987)

65. JOHN, T.M., BROWN, M.C., WIDEMAN, L., BROWN, G.M.: Melatonin Replacement Nullifies the Effect of Light-Induced Functional Pinealectomy on Nociceptive Rhythm in the Rat. *Physiol. Behav.*, 55:735-739. (1994)
66. KAVALIERS, M., HIRST, M., TESKEY, C.: Aging, Opioid Analgesia and the Pineal Gland. *Life Sci.*, 32:2279-2287. (1983)
67. KAWABATA, A., UMEDA, N. and TAKAGI, H.: L-arginine Exerts a Dual Role in Nociceptive Processing in the Brain: Involvement of the Kyotorphin-Met-Enkephalin Pathway and NO-Cyclic GMP Pathway. *Br. J. Pharmacol.* 109, 73-79 (1993).
68. KAYAALP, S.O.: Hipofiz ve Hipotalamus Hormonları: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji (Ed. Kayaalp, S.O.), Yedinci Baskı, Cilt 3, Ankara s: 2668-2714. (1997)
69. KAYAALP, S.O.: Opioid Analjezikler: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji (Ed. Kayaalp, S.O.), Sekizinci Baskı, Cilt 2, Ankara s: 981-1003 (1998).
70. KERDELHUE, B., KARTESZI, M., PASQUALINI, C., REINBERG, A., MEZZY, E. and PALKOVITS, M.: Circadian Variations in Beta-Endorphin Concentrations in Pituitary and in Some Brain Nuclei in the Adult Male Rat. *Brain Res.* 261, 243-248. (1982)

71. KLEIN, D.C.: The mammalian melatonin rhythm generating system. In: Light and biological rhythms in man. Wetterberg, (Ed), Pergamon Press. Oxford, pp. 55-71. (1993)
72. KOBAL, G., HUMMEL, T., KRAETSCH, H.G. and LOTSCH, J.: Circadian Analgesic Effects of Dyhydrocodeine and Tramadol. In: Proceedings of the 5th International Conference on Biological Rhythms and Medications, Amelia Island, F.L, Smolensky, M.h., Labrecque, g., Reinberg, A, Lemmer, B. and Haus, E. (Eds.) Houston p. xiii-5. (1992)
73. KOWANKO, I.C.R., KNAPP, M.S., POWNALL. R. AND SWANNEL, A.J.: Domiciliary Self-Measurement in Rheumatoid Arthritis and the Demonstration of Circadian Rhythmicity. *Ann. Rheum. Dis.* 41: 453-455. (1982)
74. KRAUCHI, K., CATOCHEN, C., MORI, D., GRAW, P. AND WIRZ-JUSTICE, A.: Early evening melatonin and S-20098 advance circadian phase and nocturnal regulation of core body temperature, *Am. J. Physiol.*, 272:R1178-R1188. (1997)
75. LAKIN, M.L, MILLER, C.H., STOTT, M.L., WINTERS, W.D.: Involvement of the pineal gland and melatonin in murine analgesia. *Life Sci.* 29:2543-51. (1981)
76. LEMMER, B.: Cardiovascular Chronobiology and Chronopharmacology. *Biological Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine.*(Ed. Touitou, Y., Haus, E.), Second edition, Springer-Verlag, Berlin pp: 418-427. (1994)

77. LEONHARDT, H.: *Anatomi atlası*, (çev. Kazancıgil, A., Atay, T.), Üçüncü Baskı, Cilt 2, 156, Kırklareli. (1986)
78. LEVINE, J.D., FIELD, H.L., BASBAUM, A.I.: Feature Article Peptides and Primary Afferent Nociceptor. *J.Neurosci.*, 13:2273-2286. (1993)
79. LEW, M. J., FLANDERS, S.: Mechanisms of melatonin-induced vasoconstriction in the rat tail artery: a paradigm of weak vasoconstriction, *Br. J. Pharmacol.*, 126, 1408-1418. (1999)
80. LEWY, A.J., SIEVER, L.J., UHDE, T.W., MARKEY, S.P.: Clonidine reduces plasma melatonin levels, *J. Pharm. Pharmacol.*, 38, 555-556. (1986)
81. LEWY, A.J., WEHR, T.A., GOODWIN, F.K., NEWSOME, D.A., MARKEY, S.P.: Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science*, 210: 1267-1269. (1980)
82. LIN, A.M., SCHAAD, N.C., SCHULZ, P.E., COOL, S.L., KLEIN, D.C.: Pineal Nitric Oxide Synthase: Characteristics, Adrenergic Regulation and Function. *Brain. Res.* 651:1-2, 160-8. (1994)
83. LOWENSTEIN, P.R., PEREYRA, E.N., GONZALES SOLVEYRA, C., CARDINALI, D.P.: Effect of Naloxone on the Nocturnal Rise of the Rat Pineal Melatonin Content. *Eur. J. Pharmacol.* 98:261-264. (1984)
84. LUCHELLI, A., SANTAGOSTINO-BARBONE, M.G., TONINI, M.: Investigation into the contractile response of melatonin in the guinea-pig isolated

proximal colon: the role of 5-HT₄ and melatonin receptors, *Br. J. Pharmacol.*, 121:1775-1781. (1997)

85. MACIEWICZ, R., MARTIN.: Pain: Pathophysiology and Management In "Harrison's Principles of Internal Medicine" Twenth Ed. (Willson, Y.D., Braunwald et al. Ed.) Mac Raw-Hill New York 1-93. (1991)

86. MAHLE, C.D., GOGGINS, G.D., AGARVAL, P., RYAN, E., WATSON, A.J.: Melatonin Modulates Vascular Smooth Muscle Tone. *J. Biol. Rhythms*, 2(6), 690-696. (1997)

87. MARSHALL, K. A., REITER, R. J., POEGGELER, B., ARUOMA, O. I., HALLIWELL, B.: Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro, *Free Rad. Biol. Med.*, 21,307-315. (1996)

88. MARTIN, E.G., and GRABFIELD, G.B.: Variations in the Sensory Threshold for Faradic Stimulation in Normal Human Subjects. I. The Nocturnal Rhythm. *Am. J. Physiol.*33, 415-422. (1914)

89. MARTINEZ-GOMEZ, M., CRUZ, Y., SALAS, M., HUDSON, R. and PACHERO, P.: Assessing Pain Threshold in the Rat: Changes With Estrus and Time of Day. *Physiol. Behav.* 55, 651-657. (1994)

90. MAZE, M., TRANQUILLI, W.: Alpha-2 Adrenoceptor Agonists: Defining the Role in Clinical Anesthesia. *Anesthesiology*, 75: 581-605. (1991)

91. MELCHIORRI, D., SEWERYNEK, E., REITER, R.J., ORTIZ, G.G., POEGGELER, B., NISTICO, G.: Suppressive effect of melatonin administration on ethanol-induced gastroduodenal injury in rats in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, 121, 264-270. (1997)
92. MENDELSON, W. B.: Efficacy of melatonin as a hypnotic agent, *J. Biol. Rhythms*, 12(6):651-656. (1997)
93. MENDENEZ-PELAEZ, A.: Melatonin and other indols in the rodent Harderian gland: Regulation and physiological significance In: *Advances in Pineal Research* Reither, R. J. and Lukarzyk, A. Vol. 4, John Libbey Limited, London, pp. 75-80. (1990)
94. MOLINA CARBALLO, A., MUNOZ HOYOS, A., REITER, R. J., SANCHEZ FORTE, M., MORENO MADRID, F., RUFO CAMPOS, M., MOLINA FONT, J. A., ACUNA CASTROVIEJO, D.: Utility of high doses of melatonin as adjunctive anticonvulsant therapy in a child with severe myoclonic epilepsy: two years experience, *J. Pineal Res.*, 23(2):97-105. (1997)
95. MOLLER, M., MIKKELSEN, J.D., PHANSUWAN-PUJITO, P.: Demonstration of Nerve Fibers Immunoreactive to Met-Enkephalin and β -Endorphin in the bovine Pineal Gland. In: *Role of Melatonin and Pineal Peptides in Neuroimmunomodulation*. F. Frachini, R. Reither, eds. Plenum Press, New York, pp. 15-25. (1991)

96. MONCADA , S., HIGSS, A. and FURCHGOTT, R.: XIV. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol. Rev.* 49 (2): 137-142. (1997)
97. MOORE, P.K., OLUYOMI, A.O., BABBEDGE, R.C., WALLACE, P., HART, S.L.: L-N^G-nitro arginine methyl ester Exhibits Antinociceptive Activity in the Mouse. *Br. J. Pharmacol.* 102 (1) 198-202 (1991).
98. MOORE, R.Y., SIBONY, P.: Enkephalin-like Immunoreactivity in Neurons in the Human Pineal Gland, *Brain Res.*, 457:395-398. (1988)
99. MORAWETZ, R.F., PARTH, P. and POPPEL, E.: Influence of the Pain Measurement Technique on the Diurnal Variation of Pain Perception. In: *Pain Measurement in Man*, Bromm, B. (Ed.) Elsevier, Amaterdam pp:409-415. (1984)
100. MUNOZ HOYOS A., SANCHEZ FORTE M., ESCAMES G., MARTIN MEDINA, E., REITER, R. J., MOLINA FONT, J. A., ACUNA CASTROVIEJO, D.: Melatonin's role as an anticonvulsant and neuronal protector: experimental and clinical evidence, *13(10): 501-509.* (1998)
101. MURIALDO, G., FILIPPI, U., COSTELLI, P., FONZI, S., BO P., POLLERI, A., SAVOLDI, F.: Urine melatonin melatonin in alcoholic patients: A marker of alcohol abuse? *J. Endocrinol. Invest.* 14:503-507. (1991)
102. MUSTANOJA, S.M., HÄTÖNEN, T., JOHANSSON-ALLILA, A., AND LAAKSO, M.L.: Pineal melatonin in rats: suppression by the selective α_2 -adrenoceptor agonist medetomidine, *Eur. J. Pharm.*, 326, 229-236. (1997)

103. NABER, D., COHEN, R.M., PICKAR, D., KALIN, N.H., DAVIS, G., PERT, C.B. and BUNNEY, W.E.Jr.: Episodic Secretion of Opioid Activity in Human Plasma and Monkey CSF. *Life Science* 28, 931-935. (1981)
104. NABER, D., WIRZ-JUSTICE, A. and KAFKA, M.S.: Circadian Rhythm in Rat Brain Opioid Receptor. *Neuroscience Lett.* 21, 45-50. (1981)
105. NAVA, F., CALAPAI, G., FACCIOLA, G., CUZZOCREA, S., GIULIANI, G., SARRO, A.D., CAPUTI, A.P.: Melatonin Effects on Inhibition of Thirst and Fever Induced by Lipopolysaccharide in Rat. *Eur. J. Pharmacol.* 331: 267-274. (1997)
106. OKATANI, Y., HAYASHI, K., SAGARA, Y.: Effect of estrogen on melatonin synthesis in female peripubertal rats as related to adenylate cyclase activity, *J. Pineal Res.*, 25:4, 245-50. (1998)
107. OLIVERO, A., CASTELLANO, C. and PUGLISI-ALLEGRA, S.: Opiate Analgesia: Evidence for A Circadian Rhythm in Mice. *Brain Res.* 249, 265-270. (1982)
108. PANG, S.F. AND ALLEN, A. E.: Extra-pineal melatonin in retina:Its regulation and physiological function, *Pineal. Res. Rev.*, 4:55-95. (1986)
109. PELAYO, F., DUBOCOVICH, M.L., LANGER, S.Z.: Regulation of noradrenalin release in the rat pineal through a negative feed back mechanism mediated by presynaptic α -adrenoceptors, *Eur. J.Pharmacol.*, 45:317-318. (1997)

110. PENEV, P. D., ZEE, P. C., Melatonin: A clinical perspective, *Ann. Neurol.*, 42:545-553. (1997)
111. POON, A. M., CHOW, P. H., MAK, A. S., PANG, S. F.: Autoradiographic localization of 2(¹²⁵I) iodomelatonin binding sites in the gastrointestinal tract of mammals including humans and birds, *J. Pineal Res.*, 23:1, 5-14. (1997)
112. POZO, D., REITER, R.J., CALVO, J.R., GUERRERO, J. M.: Physiological Concentrations of Melatonin Inhibit Nitric Oxide Syntheses in Rat Cerebellum. *Pharmacol. Lett.* 55(24): PL 455-460. (1994)
113. PÖLLMANN, L.: Duality of Pain Demonstrated by the circadian Variation in Tooth Sensitivity. In: *Chronobiology 1982-1983*, Ed by Haus, E. and Kabat, H., Karger, Basle, pp. 225-228. (1984)
114. PROCACCI, P., DELLACORTE, M., ZOPPI, M., and Maresca, m.: Rhythmic Changes of the Cutaneous Pain Threshold in Man. A General Review, *Chronobiologia I*, 77-87. (1974)
115. PROCACCI, P., MORETTI, R., ZOPPI, M., CAPPELLETTI, C. and VOEGELIN, M.R.: Rythmes Circadiens et Circatrigindiens du Seuil de la Douleur Cutanee Chez l'homme. *Bull. Groupe Et. Rythmes Biol.* 5, 65-75. (1973)
116. RAPOPORT, R.M., MURAD, F.: Agonist Induced Endothelium Derived Relaxation in Rat Thorasic Aorta May be Mediated Through Cyclic GMP. *Circ. Res.* 52, 352-357. (1983)

117. RATO, A.G., PEDRERO, J.Y., MARTINEZ, M.A., RIO, B., LAZO, P.S., RAMOS, S.: Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB J.*, 13: 857-868. (1999)
118. REFINETTI, R., MENAKER, M.: The Circadian Rhythm of Body Temperature. *Physiology & Behavior* 51, 613-637. (1992)
119. REITER, R. J., Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin, *Neurobiology*, 56:359-384. (1998)
120. REITER, R.J.: Alterations of the Circadian Melatonin Rhythm by the Electromagnetic Spectrum: A Study in Environmental Toxicology. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15:226-244. (1992)
121. REITER, R.J.: Interaction of Pineal Hormone Melatonin with Oxygen-Centered Free Radicals: A Brief Review, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 26, 1141-1155. (1993a)
122. REITER, R.J.: Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions, *Endocr. Rev.* 12:151-180. (1991)
123. REITER, R.J.: Static and extremely low frequency electromagnetic field exposure: Reported effects on the circadian production of melatonin. *J. Cell Biochem.* 51:394-403. (1993b)
124. REITER, R.J.: The Pineal and Its Hormones in the Control of Reproduction in Mammals. *Endocr. Rev.* 1:109-131. (1980)

125. REINBERG, A.E., SMOLENSKY, M.H.: Shift Work and Transmeridian Flights. *Biological Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. Touitou, Y., Haus, E. (Ed.) Springer-Verlag Berlin pp: 243-255. (1994)
126. REYES VAZQUEZ, C., NARANJO RODRÍGUEZ E. B., GARCIA SEGOVIANO, J. A., TRUJILLO SANTANA, J. T., PRIETO GOMEZ, B.: Apamin blocks the direct relaxant effect of melatonin on rat ileal smooth muscle, *J. Pineal Res.*, 22:1, 1-8. (1997)
127. ROTH, T., RICHARDSON, G.: Commentary: Is melatonin administration an effective hypnotic?, *J. Biol. Rhythms*, 12(6):666-669. (1997)
128. SACCO, S., AQUILINI, L., GHEZZI, P., PINZA, M., GUGLIELMOTTI, A.: Mechanism of the inhibitory effect of melatonin on tumor necrosis factor production in vivo and in vitro. *Eur. J. Pharmacol*, 343, 249-255. (1998)
129. SALIN-PASCUAL, R.J., ORTEGA-SOTO H., HUERTO-DELGADILLO L, CAMACHO-ARROYO I, ROLDAN-ROLDAN G., TAMARKIN L.: The Effect of Total Sleep Deprivation on Plasma Melatonin and Cortisol in Healthy Human Volunteers. *Sleep*, 11:362-369. (1988)
130. SCHAAD, N. C., KLEIN, D.C.: Characterization of α_2 -adrenergic receptors of rat pinealocytes, *Endocrinology*, 130, 2804-2810. (1992)
131. SCHRODER, H., WEIHE, E., NOHR, D., VOLLRATH, L.: Immunohistochemical Evidence for the Presence of Peptides Derived from

Proenkephalin, Prodinorphin and Proopiomelanocortin in the Guinea Pig Pineal Gland. *Histochemistry*, 88:333-341. (1988)

132. SESSA, W.C., HARRISON, J.K., BARBER, C.M. ZENG, D., DURIEUX, M.E., D'ANGELO, D.D., LYNCH, K.R., PEACH, M.J.: Molecular Cloning and Expression of a cDNA Encoding Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase. *J. Biol. Chem.* 267, 15274-15276. (1992)

133. SHY, T., MAK, I. T., DICKENS, B. F.: Antioxidative properties of harmaline and β -carbolines alkaloids, *Biochem. Pharmac.*, 42, 459-464. (1991)

134. SOLOMON, G.D.: Circadian Rhythms and Migraine. *Cleve. Clin. J. Med.*, 59: 326-329. (1992)

135. SPAMPINATO, S. AND GOLDSTEIN, A.: Immunoreactive dynorphin in rat tissues and plasma. *Neuropeptides*, 3:193-312. (1983)

136. SPESSERT, R., HEIL, K., GUPTA, B.B., VOLLRATH, L.: Biphasic 24-hour variations in Cyclic GMP Accumulation in the Rat Pineal Gland are Due to Corresponding Changes in the Activity of Cytosolic and Particulate Guanylate Cyclase. *J Neurochem* 59 (6) 2081-6 (1992).

137. STRIAN, F., LAUTENBACHER, S., GALFE, G. and HOLZL, R.: Diurnal Variations in Pain Perception and Thermal Sensitivity. *Pain* 36, 125-131. (1989)

138. SUGDEN, D., WELLER, J.L., KLEIN, D.C., KIRK, K.L., CREVELING, C. R.: Alpha-adrenergic potentiation of beta adrenergic stimulation of rat pineal N-acetyltransferase, *Biochem. Pharmacol.* 33, 3947-3950. (1984)
139. TALBOT, J.D., MARRET. S., EVANDS, A.C.: Multiple Representations of Pain in Human Cerebral Cortex. *Science*, 251: 3155-3158. (1991)
140. TAN, D. X., MANCHESTER, L. C., REITER, R. J., QI, W., KIM, S. J., EL-SOKKARY, G.: Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: prevention by melatonin, *J. Pineal. Res.*, 25, 184-191. (1998)
141. TOUITOU, Y., BOGDAN, A., AUZEBY, A.: Activity of melatonin and other pineal indoles on the in vitro synthesis of cortisol, cortisone and adrenal androgens, *J.Pinea Res.*, 6: 4, 341-50. (1989)
142. TOUITOU, Y., FEVRE-MONTANGE M., PROUST J., KLINGER E., NAKACHE T.P.: Age- and Sex-Associated Modification of Plasma Melatonin Concentrations in Man. Relationship to Pathology, Malignant or not, and Autopsy Findings. *Acta Endocrinol.* 108:135-144. (1985)
143. TRAUB, R.J., SOLODKIN, AND GEBHART, G.F.: A Bilateral Increase in NADPH Diaphorase Activity in The Rat Lumbar Spinal Cord Following Unilateral Hindpaw Inflammation. *Soc. Neurosci. Abst.* 18 135 (1992).
144. UDENFRIEND, S. AND KILPATRICK, D.L.: Proenkephalin and Products of its Processing; Chemistry and Biology. In: *Analysis, Synthesis,*

Biology. S. Udenfriend, J. Meinhofer, eds. Academic Press, New York, pp. 25-68.

(1984)

145. ULUDAĞ, O.: Antihistaminiklerden Mepiraminin Analjezik Etki Kalıbında L-Arjinin-NO/sGMP Yolağının Ritmik Rolü. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara, (1998).

146. UNDERWOOD, H.: Circadian organisation in lizards. The role of pineal organ. *Science*, 195:587-589. (1977)

147. VALENTI, A., IANARO, A., MONCADA, S., AND DIROSA, M.: Modulation of Acute Inflammation by Endogenous Nitric Oxide, *Eur.J.Pharmacol.* 211, 1778-1820 (1992).

148. VALLENCE, P., LEONE, A., CALVER, A., COLLIER, J., AND MONCADA, S., Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*, 339:572-575. (1992)

149. VANECEK, J.: Melatonin inhibits release of luteinizing hormone (LH) via decrease of $(Ca^{+2})_i$ and cyclic AMP, *Physiol. Res.*, 47:5, 329-35. (1998)

150. VISWANATHAN, M., LAITINEN, J AND SEAVEDRA, J.M.: Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*: 87, 6200-6203. (1990)

151. VRIEND, J., GIBBS, F.P.: Coincidence of counter-antigonadal and counter-antithyroid action of melatonin administration via the drinking water in male golden hamsters. *Life Sci.* 34:617-623. (1984)
152. VUOLTEENAHO, O., VAKKURI, O., LEPPALUOTO, J.: Wide Distribution of β -Endorphin-like Immunoreactivity in Extrapituitary Tissues of Rat. *Life Sci.*, 27:57-65. (1980)
153. WALDHAUSER, F., EHRHART, B., FORSTER, E.: Clinical aspects of the melatonin action: impact on development, aging and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance in neuroimmunoendocrine interactions, *Experientia*, 49:671-681. (1993)
154. WEEKLEY, L.B.: Melatonin-induced relaxation of aorta: Interaction with adrenergic agonists, *J. Pineal Res.*, 11, 28-34. (1991)
155. WEITZMAN, E.D., FUKUSHIMA, D., NOGÈIRE, C.: Twenty-Four Hour Pattern of Episodic Secretion of Cortisol in Normal Subjects. *J Endocrinol. Metab.* 33, 14-22. (1971)
156. WESHE, L. and FREDERICSON, R.C.A.: Diurnal Differences in Opioid Peptide Levels Correlated With Nociceptive Sensivity. *Life Sci.* 24, 1861-1868. (1978).
157. WETTERBERG, L.: Melatonin as a chronobiological marker in health and disease. In: *The pineal gland and its endocrine role* Axelrod J., Fraschini F., Velo G.P., eds. New York: Plenum Publishing Corporation, pp. 575-87. (1983)

158. WETTERBERG, L.: Melatonin in Humans. Physiological and Clinical Studies. *J. Neural. Transm. (Suppl.)*, 13:289-310. (1978)
159. WIKNER, J., HIRSCH, U., WETTERBERG, L. and RÖJDMARK, S.: Fibromyalgia-A Syndrome associated with Decreased Nocturnal Melatonin Secretion. *Clin. Endocrin.* 49: 179-183. (1998)
160. WINTERS, W.D., HANCE, A.J., CADD, G.C., LAKIN, M.L: Seasonal and Sex Influences on Ketamine-Induced Analgesia and Catalepsy in the Rat; a Possible Role for Melatonin, *Neuropharmacol.*, 25:1095-1101. (1986)
161. YAGA, K., REITER, R.J. AND RICHARDSON, B.A.: Tryptophan loading increases daytime serum melatonin levels in intact and pinealectomized rats, *Life Sci.*, 52:1231-1238. (1993)
162. YELESWARAM, K., MCLAUGHLIN, L. G., KNIPE, J. O., SCHABDACH, D.: Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications, *J. Pineal Res.*, 22, 45-51. (1997)
163. YOUNG, S.N., GAUTHIER, S., KIELY M.E., et al: Effect of oral melatonin administration on melatonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, indoleacetic acid, and cyclic nucleotides in human cerebrospinal fluid. *Neuroendocrinology*, 39:87-92. (1984)
164. ZHDANOVA, I. V., WURTMAN, R. J.: Efficacy of melatonin as a sleep-promoting agent, *J. Biol. Rhythms*, 12(6):644-650. (1997)

IX. ÖZGEÇMİŞ

21.03.1975 yılında Ankara'da doğdum. İlk öğrenimimi Ankara'da tamamladım. 1992 yılında Ankara Bahçelievler Deneme Lisesi'nden mezun oldum. 1993 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ni kazandım ve 1997 yılında mezun oldum. Halen aynı fakültenin Farmakoloji Anabilim Dalında yüksek lisans yapmaktayım.



