

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**NOS İNHİBİSYONU VE TUZ İLE
OLUŞTURULAN HİPERTANSİYONDA
MELATONİNİN KAN BASINCI, ADMA, RHO
KİNAZ, NADPH OKSİDAZ, HSP90,
KAVEOLİN-1 DÜZEYLERİ ve VASKÜLER
CEVAPLARA ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ecz.Feyzi Alper AYTURAN

ELAZIĞ-2013

ONAY SAYFASI

Doç.Dr. Oktay BURMA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof.Dr. Engin ŞAHNA

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak
kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Engin ŞAHNA



Danışman

Yüksek Lisans Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN

Prof.Dr. Engin ŞAHNA

Doç.Dr. Mehmet Kaya ÖZER



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez hazırlığım süresince bilgi ve deneyimlerinden her zaman desteğini gördüğüm saygıdeğer hocam Prof. Dr. Engin Şahna'ya katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Selçuk İlhan ve Uzm. Dr. Emre Mutlu'ya bu deneylerin gerçekleştirilmesinde yardımları olan Yrd.Doç.Dr. Deniz Erol ve Arş.Gör.Dr. Elif Onat'a, benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

Ecz. Feyzi Alper Ayturan

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
4. GENEL BİLGİLER	8
4.1 Hipertansiyon	8
4.1.1. Tuz ve Hipertansiyon	9
4.1.2.2. Nitrik Oksit ve Hipertansiyon	11
4.1.2.3. Kronik NOS İnhibisyonu Aracılı Hipertansiyon	13
4.1.3. Oksidatif Stres ve Hipertansiyon	14
4.1.4. ADMA	16
4.1.5. NADPH oksidaz	17
4.1.8. Kaveolin-1	21
4.2. Melatonin	22
4.2.1. Melatonin Sentezi	23
4.2.2. Melatoninin Farmakokinetiği	25
4.2.3. Melatonin reseptörleri ve etki mekanizması	25
4.2.4. Melatonin ve Oksidatif Stres	26
4.2.5. Melatonin ve Kardiyovasküler Sistem	27
4.2.6. Melatonin ve Hipertansiyon	29
4.3. Çalışmanın Amacı	30
5. GEREÇ VE YÖNTEM	32
5.1. Denekler	32

5.2. Deney protokolü	32
5.2.1. Hipertansiyon oluşturulması	32
5.2.2. Gruplar	32
5.2.3. Kan basıncı ölçümleri	33
5.2.4. Cerrahi uygulamalar	33
5.2.5. İn vitro deneyler	34
5.2.5.1. Fenilefrin kasılma cevapları	34
5.2.5.2. Asetilkolin gevşeme cevapları	34
5.2.6. Genetik analizler	35
5.2.6.1. RNA İzolasyonu	35
5.2.6.2. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması	36
5.2.6.3. cDNA Sentezi	36
5.2.6.4. Real Time-PCR	36
5.3. İstatistiksel analiz	37
5.4. Kullanılan Kimyasallar	37
6.BULGULAR	38
6.1. Kan basınçları	38
6.2. Torasik aortada kasılma-gevşeme cevapları	39
6.2.1. Fenilefrin kasılma cevapları	39
6.2.2. Asetilkolin gevşeme cevapları	40
6.4.1. NADPH Oksidaz ekspresyon düzeyleri	43
6.4.2 Rho Kinaz ekspresyon düzeyleri	44
6.4.3. Kaveolin-1 ekspresyon düzeyleri	45
6.4.4. Hsp90 ekspresyon düzeyleri	46
7. TARTIŞMA	47
8. KAYNAKLAR	56
9. ÖZGEÇMİŞ	65

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. 0., 14., 28. ve 42. günlerde kan basıncı değerleri	38
Tablo 2. Fenilefrin Kasılma Cevapları	39
Tablo 3. Emax ve Ec50 değerleri	41

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Melatoninin Kimyasal Yapısı	23
Şekil 2. Melatoninin Sentezi	23
Şekil 3. Pineal Bezin İnnervasyonu	24
Şekil 4. Deney Grupları	33
Şekil 5. 0., 14., 28., 42. Günlerde Kan Basıncı Değişimleri	38
Şekil 6. Fenilefrin Doz Cevap Eğrisi	39
Şekil 7. Asetilkolin Doz Cevap Eğrisi	40
Şekil 8. Asetilkolin Gevşemesi Emax Değerleri	37
Şekil 9. Asetilkolin Gevşemesi Ec50 Değerleri	37
Şekil 10. Serum ADMA Düzeyleri	40
Şekil 11. Aort Dokusunda NADPH Oksidaz Ekspresyon Düzeyleri	43
Şekil 12. Aort Dokusunda Rho kinaz Ekspresyon Düzeyleri	44
Şekil 13. Aort Dokusunda Cav-1 Ekspresyon Düzeyleri	45
Şekil 14. Aort Dokusunda Hsp90 Ekspresyon Düzeyleri	46

KISALTMALAR LİSTESİ

ADE	:	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ADMA	:	Asimetrik dimetil arginin
ANG-I	:	Anjiyotensin1
ANG-II	:	Anjiyotensin 2
ARB	:	Anjiotensin reseptör blokörü
AT1	:	Anjiotensin tip 1 reseptör
AT2	:	Anjiotensin tip 2 reseptör
Ca²⁺	:	Kalsiyum
cGMP	:	Siklik Guanozin Monofosfat
COX	:	Siklooksijenaz
DDAH	:	Dimetil arginin aminohidrolaz
DKB	:	Diyastolik Kan Basıncı
eNOS	:	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
GDP	:	Guanozin difosfat
HT	:	Hipertansiyon
IP3	:	İnozitoltrifosfat
iNOS	:	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
JGA	:	Juxtaglomerüler Aparat
CAV-1	:	Kaveolin-1
L-NAME	:	N ^o -Nitro-L-Arjinin Metil Ester
L-NMMA	:	N ^o -Monometil-L-Arjinin
L-NNA	:	N ^o -Nitro-L-Arginin
Na⁺	:	Sodyum
nNOS	:	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	:	Nitrik Oksit
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz
NOX	:	Nitrit/Nitrat
PGI2	:	Prostasiklin

PRMT	:	Protein arginin metiltransferaz
RAAS	:	Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi
RKA	:	Renal Kan Akımı
ROS	:	Reaktif oksijen ürünleri
SD	:	Sprague-Dawley
SH	:	Spontan Hipertansif
SHR	:	Spontan Hipertansif Rat
SKB	:	Sistolik Kan Basıncı

1. ÖZET

Bu çalışmada, melatoninin nitrik oksit sentaz (NOS) inhibisyonu ve tuz ile oluşturulan hipertansiyonda rho kinaz, NADPH oksidaz, hsp90, kaveolin-1 (Cav-1) aktiviteleri ve asimetrik dimetil arginin (ADMA) düzeylerine ve kan basıncı üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Ek olarak hipertansiyon oluşturulan ve melatonin uygulanan ratların aortlarında in vitro fenilefrin (phe) kasılma, asetilkolin (Ach) gevşeme cevapları araştırıldı.

Hipertansiyon oluşturmak için 6 hafta boyunca intraperitoneal (i.p.) olarak NOS inhibitörü N-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) (40 mg/kg/gün) ve içme suyuyla %1 tuz verildi. Melatonin (10mg/kg/gün) hipertansiyon oluşturulan gruba 14. günden itibaren 4 hafta boyunca i.p. uygulandı. Kan basıncı tail-cuff yöntemiyle, aorta dokusundan NADPH oksidaz, rhokinaz, Cav-1 ve hsp90 düzeyleri RT-PCR ile, serum ADMA düzeyi ise ELİSA ile ölçüldü.

Kan basınçları, NOS inhibisyonu ve tuz uygulanan grupta kontrol grubuna göre 14., 28. ve 42. günlerde anlamlı yüksek, melatonin uygulanan grupta, 28. ve 42. günde hipertansiyon grubuna göre anlamlı düşük bulundu. Melatonin grubunda, Ach gevşemesi Emax değerleri, kontrol ve hipertansiyon grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Ach gevşemesi EC50 değerlerinde ise istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. ADMA düzeyi, rho kinaz, NADPH oksidaz, hsp90 ve Cav-1 ekspresyon seviyelerinin hipertansif grupta artması, kan basıncı yükselmesine aracı moleküller olabileceğini düşündürmektedir. Melatoninin, NOS inhibisyonu ve tuz ile oluşturulan hipertansiyonda kan basıncını düşürmesi damar Ach duyarlılığını hipertansiyon ve kontrole göre arttırması yukarıdaki parametereleri olumlu yönde

etkilemesi hipertansiyon tedavisinde yeni bir tedavi yaklaşımı olabileceğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Hipertansiyon, nitrik oksit, melatonin, rhokinaz, ADMA, NADPH oksidaz, hsp90, Cav-1

2. ABSTRACT

Effects of Melatonin on Blood Pressure, Serum Level of Adma, Nadph Oxidase, Rho Kinase, Hsp90, Caveolin-1 Levels And Vascular Response In Nos Inhibition and Salt Induced Hypertension

In this study, it has been aimed to investigate the effects of melatonin on the activities of rho kinase, NADPH oxidase, Caveolin-1(Cav-1), hsp90 and on the levels of ADMA and on the blood pressure in N-nitro-L-arginine metil ester (L-NAME) and salt induced hypertensive rats. In addition to this, in vitro phenylephrine (phe) contraction and acetylcholine (Ach) relaxation responses in the aorta of rats subjected to the pharmacological treatment and developed hypertension were investigated.

In hypertension model, %1 salt in drinking water was given by oral route and L-NAME (40 mg/kg/gün) were injected intraperitoneally (i.p.) for six weeks. Melatonin was applied for 4 weeks (10mg/kg/day) intraperitoneally (after 14th day in hypertension group). Blood pressure was measured by tail-cuff method. Levels of NADPH oxidase, rho kinase, Cav-1 ve hsp90 were measured in aort tissue by RT-PCR. ADMA was measured from the serum by ELISA.

Blood pressure of the rats in hypertension group exhibites a significantly increase compared with control group on 14th (141,63±8.3; 97,33±0,84), 28th (147,71±2; 96,50±0,9295) and 42th (151,9±7,5; 100±1,41) days. On the other hand, blood pressure of melatonin group exhibites significantly decrease on 28th (124,11±5,9; 147,71±1,97) and 42th (116,43±3,9; 151,90±7,53) days compared with hypertension. It was observed that Ach Emax value of melatonin group is higher than the values of the control group and the hypertension group. However, a significantly statistical difference for Ach EC50 between three group was not observed. The

observation that the levels of ADMA, rho kinase, NADPH oxidase, hsp90 and Cav-1 expression are higher in the hypertensive group can be explained by the existence of some molecules that causes the blood pressure to increase. Since it was observed that the melatonin decreases the blood pressure caused by NOS inhibition and salt injection, increases the vascular Ach sensitivity compared to hypertension and control group, and effects the levels of ADMA, rho kinaz, NADPH oksidaz, hsp90 and Cav-1 expression positively, it can be claimed that melatonin can be used in hypertension treatment as a new treatment approach.

Key words: Hypertension, nitric oxide, melatonin, NADPH oxidase, Rho kinase, ADMA, Hsp90, caveolin-1

3. GİRİŞ

Hipertansiyon günümüzde önemli bir klinik problem olarak güncelliğini korumakta ve sebep olduğu kardiyovasküler hastalıklar açısından, dünyada başlıca ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Hipertansiyon oluşumunda en önemli mekanizmalardan biri; nitrik oksit (NO) biyoyararlanımındaki azalma sonucu endotel disfonksiyon gelişmesidir. Tuz alımına bağlı plazma volumündeki artış ve gelişen endotel hasar, hipertansiyon oluşumuna katkı sağlamaktadır. Bu sebeple tedavide tercih edilecek ilaçların NO metabolizması üzerinde olumlu etkilerinin olması beklenmektedir.

NO, L-arjinin'den NO Sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenen önemli bir moleküldür. Endotelyal hücrelerden bazal ya da uyarılmış olarak salınır ve arteriyel kan basıncı ile kan akımının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Arjinin analogu N-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME), NO sentezini inhibe ederek, vazokonstriksiyona ve sistemik hipertansiyona neden olur. Bu çalışmada hipertansiyon modeli oluşturmak için ratlara intraperitoneal (i.p.) L-NAME ve içme suyuyla tuz uygulanmıştır.

Reaktif oksijen ürünleri (ROS) ateroskleroz, hipertansiyon ve kalp yetmezliği gibi hastalıkların oluşumunda önemli rol oynamaktadır. ROS'un NO üretimini bozarak endotelyal disfonksiyon aracılığıyla hipertansiyon oluşumunda önemli etkisi bulunmaktadır (1). Vasküler duvardaki en önemli ROS kaynağı NADPH oksidaz enzimidir. Renin anjiotensin aldosteron sistemi ile NADPH oksidaz arasındaki etkileşimin yol açtığı oksidatif stres kardiyovasküler patolojilerde anahtar rol oynamaktadır. Oksidatif streste artan ve kardiyovasküler patolojilerde düzeyi yükselen diğer bir molekül, endotelyal nitrik oksit sentaz

(eNOS) inhibitörü olan ADMA'dır. ADMA, endotelial disfonksiyona sebebiyet vererek hipertansiyonun ve aterosklerozun fizyopatolojisinde önemli rol oynamaktadır (2). Bu nedenle ADMA düzeylerini azaltmaya yönelik stratejiler, hipertansiyon tedavisinde önemli yer tutmaktadır.

Rho kinaz ve NO yolları kardiyovasküler sistemde birbirine zıt çalışan iki mekanizma olarak görülmektedir. Rho kinaz apoptozis, büyüme, metabolizma, migrasyon ve kontraksiyon gibi hücresel faaliyetlerin önemli bir düzenleyicisidir. Bu önemli görevlerinden dolayı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde önemli bir terapötik hedef haline gelmiştir.

Hsp90 ve Cav-1, endotelial NOS (eNOS) üzerinden etki göstererek kardiyovasküler homeostazın düzenlenmesini etkilemektedir (3). Hsp90 moleküler bir şaperon olup oksidatif stresin, sinyal transdüksiyonunun, hücre siklusunun kontrolünde önemli rol almaktadır (4). Hsp90'ın, kronik hipoksi indüklü pulmoner hipertansiyonda, eNOS aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir (5). Hsp90 aktivite artışının eNOS'u olumlu etkileyerek NO seviyesinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (3). Hsp90'ın inhibisyonu Ach-indüklü gevşemeyi engellemiştir (3). Bu sonuçlar, hsp90 'ın NO salınımı ve endotelial fonksiyonlar açısından önemli bir molekül olduğunu ortaya koymaktadır.

Kaveoller, hücre membranlarında ekstraselüler mediyatörlerden intraselüler sinyal yollarına iletimi sağlayan yapılardır. İn vivo çalışmada, Cav-1 seviyesinin artması Ach-indüklü gevşemeyi engellemiştir (3). Bu sonuç Cav-1'in eNOS'un potent inhibitörü olduğunu göstermiştir. Bu yönüyle cav-1'in kardiyovasküler homeostazda önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (6).

Melatonin endojen senkronizör olarak, pineal bezden ağırlıklı olarak geceleri salınan antioksidan özellikleri belirgin bir indolamindir (7). Pinealektomi ve sürekli ışığa maruz bırakılma deneysel modellerinde, melatonin seviyelerinde düşme sonucu hipertansiyon gelişmektedir (8). Ayrıca, yetişkin spontan hipertansif ratlarda (SHR) hipertansiyon gelişiminden sonra melatonin seviyelerinde düşüş meydana gelmiştir ve melatonin uygulanmasıyla kan basıncının yükselmesi engellenmiştir (9). Yaşlı hastalar üzerinde yapılan klinik bir çalışmada melatonin uygulanan hipertansif hastalarda nokturnal sistolik kan basıncının daha düşük çıktığı tespit edilmiştir (10). Bu çalışmalar, melatoninin hipertansiyon tedavisinde klinik öneminin olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, tuz yüklemesi ve NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyonda melatoninin; kan basıncı, NADPH oksidaz, rho kinaz, ADMA, hsp90 ve Cav-1 düzeylerine etkileri ve in vitro deneylerde ratların aortalarında fenilefrin (phe) kasılma, asetilkolin (Ach) gevşeme cevapları üzerine etkileri incelenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Hipertansiyon

Hipertansiyon, kan basıncının yükselmesi sonucu gelişen bir hastalıktır. Sistemik kan basıncını belirleyen ve birbiriyle etkileşen birçok faktör olması sebebiyle hipertansiyondan sorumlu tek bir etiyoloji veya patofizyolojik mekanizma yoktur. Bu nedenle primer hipertansiyon olarak adlandırılır. Kan basıncının kontrolü santral sinir sistemi, böbrekler, periferik sinir sistemi, vasküler endotel ve adrenal bez arasındaki karmaşık etkileşimle sağlanır. Kan basıncını belirleyen hemodinamik parametreler kalp debisi ve periferik arteriyel dirençtir. Hipertansiyona neden olan faktörler bu ikisinden birinde veya her ikisinde artışa yol açmak suretiyle etki ederler. Debi artışı 2 farklı mekanizmayla; damar içi hacim artışı (önyük) veya kalbin nöral uyarımının artmasına bağlı kontraktilitenin artması sonucu oluşabilir. Hipertansiyon oluşumunda rolü olan patofizyolojik faktörler arasında; artmış sempatik sinir sistemi aktivitesi, sodyum tutan hormonların fazlalığı, vazokonstriktör maddelerin aşırı üretimi, vazodilatör maddelerin yetersiz üretimi, renin üretimindeki dengesizlikler, diyetle sodyumun fazla alınması, obezite, insülin direnci, diyabet, damar hücre büyümesinde etkili faktörlerin aşırı üretimi sayılabilir.

Sempatik sinir sistemindeki aktivite artışı, hem hipertansiflerde ve hem de normotansif kişilerde kalp, böbrekler ve periferik damarlar üzerindeki etkileri üzerinden kalp debisi ve damar direncini artırarak ve sıvı retansiyonuna neden olarak kan basıncında yükselmelere yol açar. Santral sinir sistemi (SSS) uyarılmasının sonunda kalp hızında artış, periferik vazokonstriksiyon, adrenallerden norepinefrin salınımı ve kan basıncında artış gerçekleşir. SSS

aktivitesinin hipertansiyon patogenezindeki spesifik rolünden ayrı olarak artmış kardiyovasküler morbidite ve mortaliteyle de ilişkisi vardır (11).

4.1.1. Tuz ve Hipertansiyon

Tuz tüketimi fazla olan toplumlarda hipertansiyon sıklığının fazla olması, tuz kısıtlaması ile kan basıncı değerlerinde düşüş tespit edilmesi ve tuzdan fakir diyetle beslenen ilkel toplumların diyetlerindeki tuz oranı arttırıldığında esansiyel hipertansiyon insidansının artması, esansiyel hipertansiyon etyolojisinde tuz alımının önemine dair ipucu vermektedir.

Normotansif kişilerde kan basıncı yükseldiğinde böbreklerden sodyum ve su atılması artar, sıvı hacmi azalır ve basınç normale döner. Bu mekanizmada meydana gelebilecek bir bozulmanın, kan basıncında yükselmeye yol açabileceği düşünülmektedir. Sodyum alımının artması, su tutulumunun ve kalp debisinin artışına yol açarak ve ayrıca renal fonksiyonları ve vasküler reaktiviteyi değiştirerek hipertansiyona neden olabilir. Diyetle alınan günlük sodyum miktarı primer hipertansiyon patogenezi ile yakından ilişkilidir. Ancak tek başına yüksek kan basıncı oluşumu açısından yeterli bir faktör değildir. Fazla sodyumun kan basıncı artırıcı etkisi ile birlikte inme, sol ventrikül hipertrofisi ve hiperfiltrasyona bağlı renal fonksiyonlarda bozukluklara da neden olabileceği bilinmektedir (12).

Yüksek dozda kronik NOS inhibitörü uygulanmasıyla oluşturulan hipertansiyonda, birinci derecede NOS'un total inhibisyonu sonucu periferik direnç artışı rol oynarken, renal tuz ve su tutulumu, sempatik sistem aktivasyonu ve oksidatif stres artışı gibi faktörlerin de gelişen hipertansiyona katıldıklarına dair bulgular vardır.

4.1.2. Endotel disfonksiyon, Nitrik Oksit ve Hipertansiyon

4.1.2.2. Endotel disfonksiyon

Endotel; vasküler tonus, trombosit adezyonu, inflamasyon, fibrinoliz ve vasküler proliferasyonu düzenleyen lokal medyatörler sağlayarak vasküler homeostazı korur. Endotelyal hücreler tüm damarların luminal yüzünü saran hücre tabakası şeklinde olup karmaşık çevresel uyarılara cevap veren bir yapıdadır. Vücuttaki en büyük endokrin organ olan endotelyum, çeşitli hastalıkların fizyopatolojisinde önemli rol oynar. Sağlıklı bireyde endotelyumdan salınan kasıcı ve gevşetici faktörler denge halinde iken ateroskleroz, hipertansiyon, kronik kalp yetmezliği, koroner kalp hastalığı ve diyabet gibi çeşitli patolojik durumlarda bu denge bozulur. Kasıcı faktörlerin salınımı artarken endotelyum bağımlı gevşeme faktörü azalır. Endotelyumun kan akışkanlığı, lipoprotein metabolizması, kapiller transport, anjiyogenezis, dolaşan kan elementleri ile kan damarları arasındaki karşılıklı etkileşimde ve vasküler yapıda önemli görevleri vardır. Endotelyal hücreler fizyolojik ve patolojik uyarılara karşı damar düz kas hücrelerinin tonusunu ayarlar.

Endotelyal hücrelerden salınan gevşetici faktörler damar tonusunu ve vasküler düz kas hücre proliferasyonunu modüle ederken; platelet ve monosit fonksiyonlarını, trombogenezis ve fibrinolizisi kontrol altında tutarlar. Hipoksi, humoral faktörler, basınç, gerilme ve sürtünme stresi gibi mekanik faktörler de endotelyumun fonksiyonlarını modüle etmektedir (14).

Endotel fonksiyonunun bozulması bu olayları olumsuz etkileyerek kardiyovasküler risk oluşturur. Bu alandaki gelişmeler, oksidatif stresin vasküler

disfonksiyon mekanizmalarını kolaylaştırdığını düşündürmektedir. Oksidatif stres durumunda endotel hücreleri koruyucu fenotiplerini kaybeder ve proinflamatuvar moleküller sentezler. Endotelyal disfonksiyonda endotel hücreleri birçok lokal parakrin etkili madde salgılayarak hipertansiyon patogenezinde aktif rol alır.. Reaktif oksijen türleri, NO inaktivasyonunu hızlandırarak vazomotor fonksiyonu bozar. Endotel hücrelerinden büyüme faktörlerinin sekresyonunu hızlandırarak endotel hücre proliferasyonuna yol açar. Ayrıca, apoptotik sinyal aktivasyonu ile endotel hücre kaybına neden olur (14).

4.1.2.2. Nitrik Oksit ve Hipertansiyon

NO seviyesinin azalması hipertansiyon gelişimi ile doğrudan ilgilidir. Bu yüzden NO'ı restore etmeye yönelik stratejiler tedavide oldukça önemlidir. NO yüksek penetrasyon ve kısa etki süreli bir gaz olup güçlü vazodilatör, trombosit adezyonu ve agregasyonunu inhibe edici, damar düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü engelleyici etkileri vardır (15). Kan basıncı değişiklikleri, damar duvarındaki gerilim ve akıma bağlı mekanik değişiklikler gibi birçok uyarana yanıt olarak endotel hücrelerinden salgılanır. Böylece bölgesel ve sistemik kan akımı ve kan basıncı regülasyonunda rol alır. NO, vazokonstriktör hormonlara yanıt olarak salgılanan bir vazodilatör maddedir ve normal kan basıncının sürdürülmesini sağlar (16). Ayrıca NO, kan basıncını organların perfüzyonunu, onlara zarar vermeden sınırla tutarak sağlayan dengeleyici bir maddedir. Kan basıncı farmakolojik olarak yükseltildiğinde, NO salgılanması uyarılır buna karşın kan basıncındaki düşme ise NO salgılanmasını baskılanır.

NOS enzimi L-argininden nitrik oksit üretimini indükler. NOS enziminin NOS1 (nNOS), NOS2 (iNOS) ve NOS3 (eNOS) olmak üzere 3 izoenzimi bulunmaktadır (17). Lokal etki gösteren ve biyolojik haberci rolü olan NO'nun kimyasal yapısı meydana getirdiği işlevleri kolaylaştıracak şekildedir. Yağda çözünebilme özelliği biyolojik membranlardan kolayca diffüze olmasını ve hücre içindeki hedef moleküllere kolaylıkla ulaşmasını sağlar.

eNOS ilk olarak endotelial hücrelerde tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan immunohistokimyasal çalışmalar birçok dokuda arteriyel ve venöz endotel hücrelerinde bulunduğunu göstermiştir. Hücrede membrana bağlı olarak bulunan eNOS aktivitesi kalsiyum iyonu, asetilkolin, bradikinin, adenosin trifosfat (ATP), elektriksel uyarı ve sıvı akımıyla uyarılabilir. eNOS enziminin ekspresyonu sabittir ve özellikle dolaşımın düzenlenmesinde, trombositlerin ve polimorf çekirdekli lökositlerin damar lümeniyle olan etkileşiminde önemli role sahiptir (17).

NOS inhibitörleri in vivo agregasyonu arttırırlar ve endotel hasarı olan bölgelerde trombosit aktivasyonunu arttırır. NO, antitrombotik etkilerine ilaveten lökosit adezyonunu da inhibe eder. L-arjinin-NO yolu renal vasküler yatak ve renal tübüler fonksiyonun kontrolüne etki ederek kardiyovasküler sistemi etkiler. NO'in diğer vasküler yataklarda olduğu gibi renal vasküler yatakta da oldukça benzer etkileri vardır. Sağlıklı yada hasta kişilerde protein alımı ve L-arjinin infüzyonu renal kan akımını ve glomerular filtrasyon oranını arttırır. Renal tübüllerde lokal NO sentezi natriüresize neden olur. NO renin sekresyonunu hem inhibe, hem de stimüle ettiğinden sonuç açık değildir. İn vitro çalışmaların farklı sonuçlar vermesine rağmen NO, insülin sekresyonunda da etkilidir (18). Endotelium tarafından bazal NO sentezi, vasküler tonusu düzenler ve endotelium ile hücreler

arasındaki etkileşmeyi azaltır. Bu nedenle L-arjinin–NO yolundaki artan yada azalan aktiviteler, çeşitli kardiyovasküler hastalıklara neden olur. Esansiyel hipertansiyon, sekonder hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon, insülin bağımlı diabetes, hiperkolestrolemi, ateroskleroz, akut ve kronik renal yetersizlik de aktivite azalırken bakteriyel sepsis kardiyomiyopati ve glomerulonefritte ise aktivitesi arttığı bildirilmiştir (18).

4.1.2.3. Kronik NOS İnhibisyonu Aracılı Hipertansiyon

Esansiyel hipertansiyon araştırmalarında, kronik NOS inhibisyonu yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Total periferik direnç artışının, artmış renal sodyum tutulumunun, sempatik sistem aktivasyonunun ve çeşitli vazoaaktif maddelerin, kronik NOS inhibisyonu aracılı hipertansiyonun gelişimine katkısı olduğu ileri sürülmektedir. Genel olarak NOS inhibitörlerinin düşük dozlarının uygulanması ile oluşturulan hipertansiyondan daha çok sodyum tutulumunun, NOS inhibitörlerinin yüksek dozları ile oluşturulan hipertansiyondan ise daha çok total periferik direnç artışının sorumlu olduğu düşünülmektedir (17).

Kronik NOS inhibisyonu sonucu gelişen hipertansiyonda uygulanan NOS inhibitörlerinin kullanım sürelerine ve dozlarına bağlı olarak kalp ve böbrekler başta olmak üzere birçok organ ve dokuda hasarlar meydana gelmektedir. Yüksek doz L-NAME uygulanan sıçanlarda hipertansiyon sonrasında sürekli kan basıncı yüksekliğinin sonucu olarak kardiyovasküler hipertrofi, rezistan damarların media kalınlığı/lümen çapı ve kalp/vücut ağırlığı oranlarında artış olmuştur (19). Kronik NOS inhibisyonu kardiyak hipertrofi ile beraber arteriyel hipertansiyona koroner arter ve aort etrafında fibröz doku oluşumuna ve bu damarların media tabakasında

hiperplaziye, sol ventrikül hipertrofisine ve miyokardda iskemik lezyonlara neden olmaktadır. SHR’da yapılan bir çalışmada hipertansiyona bağılı olarak kardiyak hipertrofi, miyokardiyal fibrozis, fokal miyosit dejenerasyonu ve miyokardiyal küçük arterlerde mikroarteriyopati meydana gelmiştir (20). Esansiyel hipertansiyonda endotele bağılı vazodilatasyon cevabının bozulması ve vazokonstriktörlere olan hassasiyetin artması periferik damar direncini arttırabilmektedir.

4.1.3. Oksidatif Stres ve Hipertansiyon

Hücresele düzeyde yüksek miktarda üretilen serbest oksijen radikallerinin yol açtığı toksik etkiler vücuttaki antioksidan savunma sistemiyle yok edilmeye çalışılır. Antioksidan savunmanın yetersiz kaldığı durumlarda ortaya çıkan oksidatif stres, yaşlanma ve birçok hastalığın oluşum sürecinde önemli rol oynar. Oksidatif stresin endotel disfonksiyonu, hipertansiyon, ateroskleroz, kalp yetmezliği ve reperfüzyon hasarı gibi birçok önemli kalp hastalığının oluşumu ve ilerlemesinde önemli rolü vardır. Sonuçta, oksidatif stres DNA mutasyonları, hücre ölümleri ve patolojiler gibi hasarlara neden olur.

Oksijenin kısmi indirgenmesiyle oluşan $O^{\cdot -}$, süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi aktive olmuş oksijen türleri oldukça reaktiftir ve kalp gibi organlarda toksik etkilere yol açar (13). Serbest oksijen radikalleri, hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürür; membran lipid ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engeller; çekirdek membranını yararak çekirdekdeki genetik materyale etki edip DNA’yı kırılma ve

mutasyonlara açık hale getirir; immün sistemdeki hücreleri yok ederek immün sistemi bozar.

Moleküler, hücresel ve doku düzeyindeki oksidatif hasarın en aza inebilmesi için oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge sağlanmalıdır. Kalp hastalıklarına karşı miyokardiyal savunma bu açıdan birkaç aşama gösterir. Birincil savunma hücre içi antioksidanlardan [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GSH-redüktaz), vb.] oluşur. İkincil savunma lipolitik ve proteolitik enzimleri (proteaz, fosfolipaz, vb.) içerir.     nc l savunma da, oksidatif stres sonucunda artan reaktif oksijen türleriyle ba a çıkabilmek amacıyla, kalpteki gen ve proteinlerden (redoks duyarlı transkripsiyon faktörü olan) nükleer faktör kB (NF-kB) sayesinde hücre içi antioksidanların üretimini artırılmasıdır (13).

Dolaşımdaki homeostaz kontrolü, vasküler endotelin kimyasal, hormonal ve hemodinamik değişikliklere olan yanıtına bağlıdır. Hipertansiyonda, endotelle ilişkili (prostaglandinler, endotelden salınan hiperpolarize edici faktör ve nitrik oksit) vazodilatör sistemlerdeki bozukluk endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır. Hipertansiyonda, serbest radikallerin yol açtığı nitrik oksit yıkımı kritik rol oynamaktadır. Yine, NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz gibi süperoksit üreten enzimlerin hipertansiflerde yükseldiği gösterilmiştir (2). Hipertansif hastalarda kan SOD aktivitesinin düşük olduğu gösterilmiştir (13). Ayrıca, süperoksit anyonlar hipertansiyonla ilişkili kardiyak hipertrofi, inme ve böbrek hasarının gelişmesinde rol oynamaktadır. Kan basıncı normal olan sıçanlarda, tuz yüklemesinin dirençli damarlarda reaktif oksijen türlerinin üretimini artırdığı ortaya konmuştur. Ayrıca, hipertansiyonda vazokonstriktör siklooksijenaz ürünlerinin

arttığı ve ksantin oksidaz yolundan oluşan O^{2-} ve OH^- radikallerinin bu olayı olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Tüm bunlar, reaktif oksijen türlerinin hipertansiyondaki önemini ortaya koymaktadır (13). Endotel disfonksiyonun gelişiminde önemli etkenlerden biri olan oksidatif stresle ilişkili, artan veya azalan birçok parametre vardır. ADMA, NADPH oksidaz, rho kinaz, hsp90 ve Cav-1 hipertansiyon ile ilişkisinin olduğu düşünülen moleküllerdir.

4.1.4. ADMA

ADMA plazmada, idrarda ve dokularda bulunan, arginine benzeyen bir aminoasittir. Proteinlerdeki arginin kalıntılarının metillenmesiyle doğal olarak oluşabilmektedir. Damarlardaki dominant NOS izoformu olan eNOS inhibisyonunu kompetitif olarak yaparak hipertansiyonun ve aterosklerozun fizyopatolojisinde önemli olan endotelial disfonksiyona neden olur (21).

ADMA, nitrik oksit biyosentezinin major inhibitörüdür (22). ADMA, sıklıkla nukleusta bulunan, metilenmiş arginin rezidüleri içeren polipeptidlerin veya proteinlerin katabolizmasına bağlı olarak oluşur ve proteinlerin hidrolizi sonucu serbestleşir.

Sağlıklı kişilerde plazma ADMA düzeyleri 0.2-1.2 mmol/L arasındadır (23). Patolojik durumlarda ADMA düzeylerinde artış görülebilmektedir. Yüksek plazma ADMA düzeyleri, kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere diğer birçok hastalıkta saptanmıştır. Her gün yaklaşık 60 mmol ADMA idrarla atılabilmektedir (24). ADMA' nın idrarla atılımının tamamen bozulması, plazma ADMA düzeylerinde artışa sebep olur. Proteoliz artışına bağlı olarak, dokulardan plazmaya

hızlı ADMA geçişi veya ADMA serbestleşmesinin ani artışı, plazma ADMA düzeylerinde ani değişikliklere neden olabilmektedir (24).

ADMA'ya uzun süre maruz kalma, aterogenezi artırır ve hipertansiyon gelişimine neden olarak organ hasarlarına yol açabilmektedir. ADMA tarafından uzun süre NOS inhibisyonu, sol ventrikül hipertrofisine yol açabilir. ADMA, kalp hızını ve kardiyak outputu düşürür (23). ADMA'nın intraarteriyel infüzyonu lokal vazokonstriksiyona sebebiyet verirken, sistemik infüzyonu ise vasküler direnci artırır ve böbrek işlevlerini bozar. Deneysel ve klinik birçok çalışmada ADMA düzeylerindeki küçük değişikliklerin dahi damarlardaki NO üretiminde, vasküler tonusta ve sistemik vasküler dirençte anlamlı değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (23).

Esansiyel hipertansiyonda endotel bağımlı vazodilatasyon bozulmuştur. Vazodilatasyonda bozulma; eNOS aktivasyonuna yol açan fosfoinozitol yolundaki spesifik defekte bağlı NO sentezindeki azalmaya, artmış süperoksit üretimine bağlı NO yıkımının artmasına ve NO'nun endotel kökenli faktörler ile etkileşimine bağlanmıştır. ADMA, eNOS'u inhibe ederek NO sentezini azalttığı için hipertansiyonun patogenezinde önemli yer tutmaktadır (25). ADMA, endotelde bulunan lokal renin-anjiyotensin-aldesteron sistemini aktive edebilmektedir. Bu özellikleriyle ADMA, hipertansiyon patogenezinde önemli bir aminoasittir.

4.1.5. NADPH oksidaz

Birçok kardiyovasküler hastalığın patofizyolojisiyle ilişkili olan ROS'un major kaynağı NADPH oksidaz enzim ailesidir (NOXs) (26). Bu enzimlerin hücrenin büyüme, diferansiyasyon, migrasyon ve proliferasyon gibi

fonksiyonlarıyla ilişkili redoks duyarlı sinyal yolunun modülasyonunda önemli oldukları belirlenmiştir. Redoks sinyali ve oksidatif stres ateroskleroz, hipertansiyon ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler durumlarda önemlidir. Ang II'nin hipertansiyon üzerine olan etkisi kısmen aydınlatılmış olup damar hücrelerinde bulunan NADPH oksidaz sistemini aktive ettiği belirlenmiştir. Hipertansif hastaların, anjiyotensin reseptör blokerleri ile tedavi edilmesi sonucunda sadece tansiyonlarının düşmediği, aynı zamanda ROS'un bir göstergesi olan malondialdehit miktarlarının da azaldığı görülmüştür (26).

Damarın bütün tabakalarında NADPH oksidaz enzim ailesi eksprese olduğundan kan basıncı regülasyonunu etkiler (27). Damar duvarında ROS vasküler direnci ya direkt vasküler tonus modülasyonu ya da vasküler remodelingi değiştirerek etkilemektedir. Vasküler süperoksit üretimi NO inaktivasyonuna ve peroksinitrit oluşumuna neden olarak vazokonstriktör etkiye sebebiyet vermektedir. NADPH oksidaz etkisiyle redoks duyarlı sinyal yolunun aktivasyonu vasküler remodelingde ve kronik hipertansiyonda önemlidir.

Anjiyotensin II indüklü hipertansiyon modelinde ROS üretiminde artış belirlenmiştir. Bu artış ise damar duvarındaki bütün hücrelerde ekspresyonu ve aktivitesi artan NADPH oksidaz enzimiyle ilişkilendirilmiştir. Anjiyotensin II indüklü hipertansiyonda farelere NADPH oksidaz inhibitörü gp91-dstat peptidi verilmesi kan basıncını ve süperoksit üretimini anlamlı şekilde düşürmüştür (27). İnsanlarla yapılan çalışmalarda, esansiyel hipertansiyonla ilişkili artmış vasküler NADPH oksidaz ekspresyonu arasındaki ilişki arterlerden alınan biyopsilerle gösterilmiştir. Ayrıca hipertansif hastalardaki endotelial disfonksiyon artmış

NADPH oksidaz bağımlı ROS üretimine dayandırılabilir (28). Bu veriler, oksidatif stresin, hipertansiyonun bir modülatörü olduğunu gösterir.

4.1.6. Rho Kinaz

Rho proteinleri, başlıca hücre iskeleti kontrolünden, stres liflerinin yapılanmasından, fibroblastların yapışmasından ve düz kas kasılmasında kalsiyuma duyarlılığın düzenlenmesinden sorumludur (29). Rho izoformları arasında vücutta çeşitli hücrelerde varlığı gösterilen ve üzerinde en fazla çalışılan Rho A'dır (30).

Rho kinaz, düz kas kasılması, aktin hücre iskeleti oluşumu, hücre yapışması ve hareketliliği, çoğalması, sitokinaz ve genetik bilginin genden proteine aktarılması gibi kardiyovasküler hastalıkların patojenezinde rol oynayan çeşitli hücre işlevlerine aracılık etmektedir (29). Rho kinazın damar düz kas hücrelerinin kasılmasında önemli olduğu önceki çalışmalarda belirlenmiştir. Bu durum, Rho kinaz inhibitörlerinin koroner ve serebral vazospazm, hipertansiyon ve pulmoner hipertansiyon ile miyokardial iskemi reperfüzyon hasarı gibi damar düz kas hücresi aşırı kasılmasının neden olduğu kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yararlı olabileceklerini göstermektedir (31).

NO ve Rho kinaz yolları özellikle kardiyovasküler (KVS) sistemde birbirine zıt çalışan iki mekanizma olarak görülmektedir. Rho kinazın hipertansiyon, koroner arter spazmı, anjina, ateroskleroz, miyokardial iskemi ve reperfüzyonun neden olduğu zedelenme ve restenoz gibi düz kas hücrelerinin aşırı kasılmasının eşlik ettiği çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynadığı bilinmektedir.

4.1.7. Hsp90

Fizyolojik koşullarda, bu molekülün görevi; proteinlerin çökmesini önlemek, yeni sentezlenen proteinlerin üçüncül yapılarını kazanmasını sağlamak, yanlış katlanmış ve çökmüş proteinleri birbirinden ayırmak ve doğru katlanmasını sağlamak, ribozomdan görev alacağı yerlere taşımaktır. Stres koşullarında bu proteinlerin sentezi hızlanır. Hücre farklılaşmasında da önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Gerek hücre içinde sitoplazma ve organellerde (mitokondri, endoplazmik retikulum); gerek hücre dışında görülebirlirler, hatta hücre membranlarında bile gözlenebilirler.

Moleküler bir şaperon olan hsp90, eNOS aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. eNOS'u regüle edici olması kardiyovasküler hastalıklar açısından önemini ortaya koymaktadır.

Bazı şaperonlar işlev görebilmeleri için ko-şaperonlarına ihtiyaç duyarlar. Bu amaçla Hsp90'ın ATPaz bölgesini hedefleyen geldanamisin ve türevi antibiyotikler klinik kullanımda yer almaktadır. Geldanamisin hsp90'ı inhibe ederek yokluğunda ortaya çıkacak sonuçlarla ilgili yorum yapılmasını kolaylaştırmaktadır. Geldanamisin uygulanan ratların aortik halkalarında asetilkolin indüklü gevşeme cevapları azalmıştır (32). Başka bir çalışmada, portal ven ligasyonu yapılan ratlarda eNOS ve hsp90 seviyeleri kontrol grubuna göre paralellik göstermiş olup asetilkolin indüklü gevşeme cevaplarında geldanamisin uygulamasının gevşeme cevaplarını azalttığı görülmüştür (33). Bu bulgular, hsp90'ın endotelial fonksiyon ve NO salınımı için önemli olduğunu göstermektedir.

4.1.8. Kaveolin-1

Kaveoller lipid yığınlarının bir altkümesi olarak plazma membranlarında çeşitli hücrelerin içerdği endotelial, düz kas, epitel hücreler ve fibroblastlarda bulunmuştur. Kaveolin'in en önemli işlevlerinden biri, bir platform olarak hizmet etmesidir. Kaveoller, transitoz, endositoz, hücre çoğalmasının düzenlenmesi, diferansiyon ve apoptozis de önemli rol oynamaktadır. Cav-1 kaveollerde esas protein olup birçok protein grubunun; G-proteinleri, H-Ras, PKC, eNOS, integrinler ve büyüme faktörü reseptörleri olan VEGF-R ve EGF-R ile bağlantı kurup düzenlenmesini sağlar. Cav-1 bu sinyalcı proteinleri stabilize etmektedir (34).

Kaveol proteinin yapı taşı olan kaveolinler 3 izoformda bulunmaktadır. Cav-1 (CAV-1) birçok kas olmayan hücre tiplerinde kaveol oluşumu için, CAV-2 membran lokalizasyonuna için gereklidir. CAV-3 ise çizgili (iskelet ve kardiyak) düz kas hücreleri içinde kaveol oluşumu için gereklidir.

Endotelial hücreler, Cav-1'in en fazla seviyede olduğu düşünülen yapılardır. Endotelial hücrelerin esas fonksiyonları vasküler yapıyı ve tonusu oluşturmalarıdır. Diğer bir önemi ise düz kas hücreleriyle kan akımı arasında kalan arayüzdür. NO, endotelium bağımlı hiperpolarizan faktör (EDHF) ve PGI₂ endotelial hücreler tarafından salınan potent vazodilatör ve antimitojenik faktörlerdir. Sürekli Ca²⁺ girişi endotelial hücrelerin Cav-1 aracılığıyla düzenlenip NO, EDHF ve PGI₂ aktivasyonu ile sağlanır. eNOS, L-argininden NO sentezlenmesini katalizler ve optimum aktivasyon için, eNOS kaveolü hedef alır. In vivo çalışmalar da Cav-1, eNOS'un negatif regülatörü olarak görülmüştür. Asetilkolin indüklü gevşeme cevaplarında Cav-1 seviyesinin artması potent eNOS

inhibitörü olması sebebiyle gevşeme cevaplarını engellemiştir. Genetik araştırmalarda, Cav-1 knockout farelerde, Cav-1'in eNOS'u negatif etkilediği gösterilmiştir. Bu farelerde hem bazal hemde stimüle edilen eNOS aktivitesinin ve gevşeme cevaplarının arttığı tespit edilmiştir (35). Bu veriler hipertansiyon gelişiminde NO yolağı üzerinden Cav-1'in önemli bir molekül olabileceğini göstermiştir (34,36).

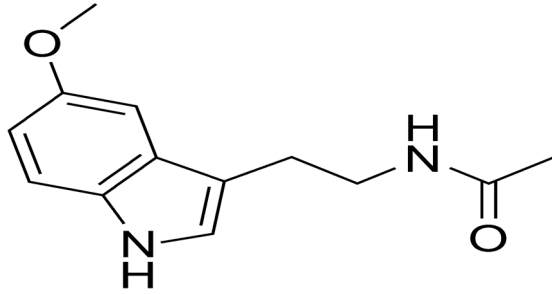
4.2. Melatonin

Melatonin, memelilerin başlıca beyinde serebral yarıküreler arasındaki pineal bezden ve ayrıca over, lens ve kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur. Melatonin diğer hormonların regülasyonunu ve organizmanın sirkadyen ritmini düzenler. Küçük moleküllü olması nedeniyle organizmada yaygın dağılım gösterir, hücrel kompartmanlara kolayca girer. Güçlü antioksidan özelliği olan bu doğal bileşik in vitro ve in vivo güçlü bir sitostatik ajandır. Melatoninin etkinliği oküler hastalıklarda, diyabette, romatoid artrit, fibromyaljide, kronik yorgunluk sendromunda, enfeksiyon hastalıklarında, kardiyovasküler hastalıklarda, nörolojik hastalıklarda, uyku bozukluklarında, yaşlanmada ve depresyonda gösterilmiştir (37, 38).

Retinada sentezlenen melatonin retinal pigment epitel fonksiyonunun ve fotoreseptörlerdeki gece-gündüz varyasyonuna karşı retinanın vereceği yanıtın düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Deride; pigment granüllerin değişiminden ve derin dokuların güneşin zararlı radyasyonuna karşı korunmasından sorumlu olan melatonin, gastrointestinal kanalda enterokromofin hücrelerde sentezlenmekte ve postprandial olarak dolaşıma salıverilmektedir. Safrada sentezlenen melatonin ise

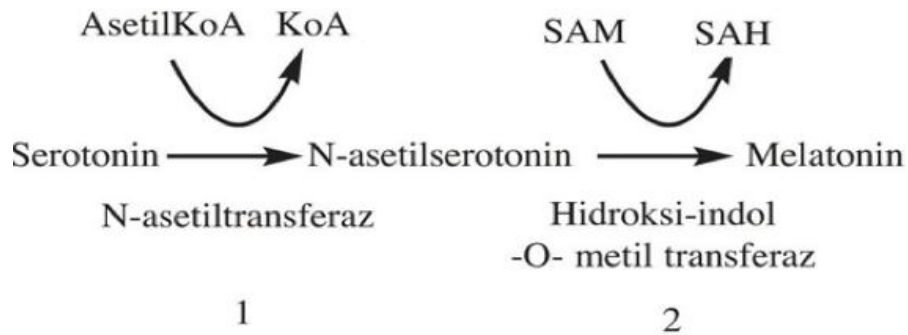
okside kolesterol türevlerine ve safra asidine karşı safra yollarının mukozasını ve epitelini korumaktadır (39).

4.2.1.Melatonin Sentezi



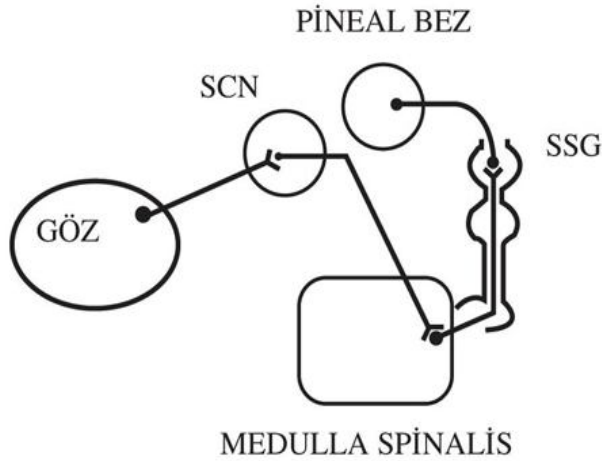
Şekil 1. Melatoninin kimyasal yapısı(N-asetil-5-metoksitriptamin)

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin, Şekil 1) sentezinde birinci basamak triptofanın pinealositler içine alınması ve orada pineal bir enzim olan N-asetiltransferaz (NAT) tarafından N-asetil serotonine dönüştürülmesidir. N-asetil serotoninin melatonine dönüşümü diğer bir pineal enzim olan hidroksiindol-o-metiltransferaz (HIOMT) aracılığı ile olur (Şekil 2). Melatonin pineal bezin endokrin hücreleri olan pinealositlerden hızla salgılanmaktadır.



Şekil 2. Melatoninin sentezi (SAM: S-adenozil metionin, SAH: S-adenozil homosistein).

Melatoninin pineal bezde sentezi, suprakiazmatik nükleus tarafından 24 saatlik aydınlık/karanlık siklusuna göre ayarlanır. Sentez ve salınım, karanlıkta uyarılmakta, ışık ile inhibe olmaktadır. Retinadan gelen fotik bilgi hipotalamusun suprakiazmatik nükleusundan geçerek pineal beze taşınmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. Pineal bezin inervasyonu (SSG: Superior servikal ganglion)

Işık altında, retinadan başlayan nöronal impulslar, hipotalamusta SCN ve diğer hipotalamik yapılara aktarılır. Uyarı SCN ve periventriküler nükleus (PVN) aracılığı ile superior servikal gangliyona geçer. Karanlıkla birlikte postganglionik sempatik liflerden salıverilen noradrenalin esas olarak β_1 reseptörlere bağlanarak, depolardaki serotonin ve NAT'ın intrasellüler salıverilmesine neden olur. Nöronlarda ve pineal bezdeki biyokimyasal sinyallerin bu döngüsü insanda melatonin anabolizmasını hızlandırır ve aynı zamanda melatoninin gün içi ritme bağlı olarak sentez ve salıverilmesini oluşturur (40).

4.2.2.Melatoninin Farmakokinetiği

Suda kısmen ve lipidlerde yüksek oranda çözünen melatonin dolaşıma salıverildiğinde dokulara ve hücrelere kolaylıkla girebilmektedir. Jelatin kapsüller yada tablet şeklinde oral uygulanan melatonin insanda yaklaşık 60 dakikada pik plazma düzeyine ulaşır. Oral uygulamada ilk geçiş etkisine maruz kalır. Melatonin esas olarak karaciğerde önce hızla 6-hidroksidopamine, sonra bir dizi reaksiyon ile N-asetil-5-metoksi-6- hidroksitriptamin'e ve daha sonra da sülfat veya glukronid ile konjuge olarak 6-sülfatoksimelatonin'e dönüşür ve idrar ile atılır. İdrarda %1 oranında değişmemiş şekli bulunmaktadır (41).

4.2.3.Melatonin reseptörleri ve etki mekanizması

Melatonin suya göre lipid çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle hücrelere rahatça girebilmektedir. Bu nedenle etkileri sadece membrana yönelik değildir. Sulu ortamda kısmen çözünmesi de intrasellüler etkilerinin oluşmasına katkıda bulunur. Son çalışmalar melatoninin nukleusta yüksek konsantrasyonda bulunduğunu ve melatonin için spesifik bağlanma noktalarının olduğunu göstermiştir. Bu bulgulara göre melatonin etkilerinin tiroid ve steroid hormonlara benzer şekilde nukleustaki moleküler olaylarla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (42).

Melatoninin ML1 ve ML2 olarak bilinen farklı farmakolojik ailelere ait membran bağımlı iki tip reseptörü tanımlanmıştır.

ML1 reseptörleri renal fonksiyon, uyku, sirkadiyen ritm, üreme ve serebral arter kontraktilesinden sorumludur. Bu reseptörler memeli retinasında Ca^{+2}

bağımlı dopamin salıverilmesi ve retinal fotopigment disklerinin fagositozu gibi ışığa bağımlı olaylarda rol oynar (43).

Düşük afiniteli ML2 reseptörlerinin de G-proteinleri ile kenetli olduğu ve sinyal iletiminde ML1 reseptörlerine benzer davranışta bulunduğu ileri sürülmektedir. Ancak ML1'lerden farklı olarak ML2 reseptörlerinin aktivasyonunun fosfoinozimid (PI) hidrolizi ile kenetli olduğu ve selektif ML2 antagonisti uygulananının bu hidrolizi geri çevirdiği belirtilmiştir (43).

4.2.4. Melatonin ve Oksidatif Stres

Melatoninin antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkisinin reseptör aracılı olmadığı ve bu etkilerin fizyolojik konsantrasyonların üzerinde olduğu bildirilmektedir (44). Melatonin hidroksil ve peroksil radikallerinin güçlü bir süpürücüsüdür. $\cdot\text{OH}$ radikalini nötralize edici etkisi glutatyondan 5 kat ve $\text{ROO}^\cdot$ inaktivasyonunda ise E vitamininden 2 kat fazla etkilidir. Melatonin ayrıca inflamasyon reaksiyonları sırasında makrofajların aktivasyonu ile oluşan ve toksik bir oksijen türevi olan (HOCl)'e karşı da süpürücü etki göstermektedir. Ancak melatoninin HO ve $\text{O}^\cdot$ radikalleri üzerine direkt süpürücü etkisi zayıftır. Melatoninin H_2O_2 ile reaksiyonu sonucu N-asetil-N-formil-5-metoksi knüramin (AFMK) olduğu, AFMK'nın ise katalazla N¹-asetil-5-metoksi knüramine dönüştürüldüğü ve antioksidan etkiye sahip bu metabolitlerin melatoninin süpürücü etkisini artırdığı bildirilmiştir (45).

Melatoninin serbest radikaller üzerinde dolaylı etkileri de vardır. Melatonin, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive ederek, $\text{O}^\cdot$ radikalini HO'ye kataliz eden SOD aktivitesini artırarak, oksidatif stres esnasında katalaz

aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve NO oluşumundan sorumlu NOS enzimini inhibe ederek, antioksidan etki göstermektedir (44).

Antioksidan savunma sistemi ile ilişkili diğer bir enzim sitokrom P450 enzimidir. Bu enzim ksenobiyotik metabolizması aracılığı ile serbest radikal oluşumunu artırır. Melatonin'in P450 aktivitesini azaltarak serbest radikal oluşumunu ve dolayısı ile oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (46).

Melatonin fizyolojik konsantrasyonlarda serebellumda NOS aktivitesini baskılayarak nöral ve kardiyovasküler fonksiyonların fizyolojik düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu etki de melatoninin serbest radikal oluşumunu önleyici etkisine aracılık etmektedir. NO[•] tek başına bir serbest radikaldir ve O^{•-} varlığında ONOO⁻ oluşumunu artırır. Melatonin ile NOS aktivitesinin baskılanması NO oluşumunu azaltarak bu yolak üzerinden oksidatif hasarı azaltmaktadır (44). Melatoninin serbest radikaller üzerindeki süpürücü etkisi onun aynı zamanda güçlü bir antiinflamatuvar ajan olduğunu da açıklamaktadır. İnflamasyonun uyarılmasıyla doku hasarına giden yolak üzerinde çeşitli kademelerde melatonin ile blokaj bu ajana antiinflamatuvar ve doku koruyucu etki sağlamaktadır.

Çeşitli inflamasyon modellerinde (yanık hasarı, sepsis, iskemi/reperfüzyon gibi) nötrofil aktivasyonunun dokularda neden olduğu oksidan hasarları melatonin anlamlı olarak geri çevirmiştir (37,47-50).

4.2.5. Melatonin ve Kardiyovasküler Sistem

Gelişmiş ülkelerde ölüm nedeni olarak kardiyovasküler hastalıklar en üst sırada yer almaktadır. Yapılan birçok çalışma, kardiyovasküler olaylarda (miyokardiyal enfarktüs, inme, kompleks aritmiler, ani kardiyak ölümler, vb.) sirkadiyen biyolojik ritmin önemini göstermektedir. Tüm organizmalarda

gece/gündüz veya karanlık /aydınlık döngüsü ile bağlantılı olarak biyolojik ritimler mevcuttur. Bu ritimlerin insanlarda çeşitli fizyolojik fonksiyonları etkiledikleri kabul edilmiştir.

Kardiyovasküler olayların insidansı sabahın erken saatlerinde maximum seviyeye ulaşmaktadır. Bu duruma ek olarak, birçok patofizyolojik mekanizma katılmaktadır. Bunlar; artan kan basıncı, kalp hızının dalgalanması, periferik ve koroner arterlerde düşen endotelial dilatör kapasitesi, artan sempatik aktivite, yükselen platelet agregasyonu sayılabilir. İnsidansının yüksek olması nedeniyle kardiyovasküler hastalıklarda yeni tedavi yöntemleri bulabilmek oldukça önemli bir hale gelmiştir.

Melatoninin kardiyovasküler sistemin çeşitli fonksiyonlarına etkiler gösterdiği doğrulanmıştır. Benzer diğer organlar ve sistemler, kardiyovasküler sistem gibi melatoninin etkileyen sistem aracılığıyla suprakiazmatik nükleusun modüle edilmesiyle günlük ve mevsimsel ritimlerin oluşturulmasını sağlar. Kalp hızı, kan basıncı, trombosit ve endotel fonksiyonlarını suprakiazmatik nükleus düzenlemektedir.

Paskaloglu ve ark. (51) diyabette insülin ve melatoninin kullanımının hiperglisemi indüklü oksidatif strese, sınırlı koruyucu etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. İnsülin ve melatoninin kombine kullanımını ise hiperglisemiyi suprese ettiği, oksidatif hasarın engellendiği, endotelial fonksiyonun iyileştiğini göstermektedir. Bu da kombine kullanımının tedavide daha yararlı olacağını göstermiştir. Yapılan çalışmalarda melatoninin, I/R indüklü kardiyak infarkt alanının azalmasını sağladığı görülmüştür (48-50). Bu etki iskemik kalp hastalığının

önlenmesinde ve tedavisinde melatoninin önemli koruyucu bir molekül olabileceğini göstermektedir.

Düşen melatonin seviyeleri sonucunda koroner arter hastalığı, hipertansif kalp hastalığı ve dilate kardiyomiopati gibi birçok kardiyovasküler hastalık meydana gelmektedir (52). Antihipertansif, anti-iskemik ve antioksidan bir ilaç olarak melatonin kullanımı tedavide sirkadiyen ritmi düzenleyerek kardiyovasküler disfonksiyonların tedavisinde yeni bir bakış açısı getirmektedir.

Melatoninin safra ligasyonu ile artan ADMA, NADPH oksidaz ve NADPH oksidaza bağlı superoksit üretimini azalttığı bildirilmiştir. Melatonin ile yapılan başka bir çalışmada, kanser hücrelerinde rho kinaz aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (61,72,89).

4.2.6. Melatonin ve Hipertansiyon

DeneySEL ve klinik çalışmalarla melatoninin hipertansiyon üzerine olumlu etkileri rapor edilmektedir. Pinealektomi sonucu hipertansiyon gelişen ratlarda melatonin uygulamasıyla kan basınçları normale döndürülmüştür (53). Plazma melatonin konsantrasyonlarıyla kan basıncının akrofazi arasında ters bir ilişki bulunmaktadır. Yüksek melatonin konsantrasyonlarında düşük kan basıncı ölçülmektedir. İnsanlarda yapılan çalışmalarda ekzojen melatonin uygulanması; normotansif hastalarda (54), esansiyel hipertansiyonu olan hastalarda (55) ve tip 1 diyabeti olan hastalarda (56) kan basıncını düşürmüştür.

Melatonin eksikliğine bağlı iki tip deneySEL hipertansiyon modeli vardır (8). Birincisi pinealektomi yapılarak oluşturulan diğeri ise 24 saat ışığa maruz bırakma sonucu oluşturulan hipertansiyon modelidir. Sürekli aydınlık ortamda bulunan

deneklerde gece salınan melatonin miktarı azalmaktadır. Melatonin eksikliği sonucu kan basıncı yükselmekte ve miyokardiyal, renal ve vasküler disfonksiyonlarla ilgili olduğu düşünülmektedir (52,56). Melatonin azalması nörohumoral aktiviteyi etkileyerek RAS ve SSS aracılığıyla kan basıncının yükselmesine neden olmaktadır. Bu etki onu hipertansiyon tedavisinde önemli bir molekül olduğunu düşündürmektedir.

Pineal bezden üretilen melatonin miktarı, memelinin yaşına göre değişiklik gösterir (57,58). Antihipertansif tedavide uzatılmış-salınımlı melatonin tedavisi uygulanarak nokturnal hipertansiyonda kan basıncının düzenlenmesi sağlanmıştır (59). Uykusuzluk, hipertansiyonda tedaviyi zorlaştıran en önemli faktörlerden biridir. Yapılan testlerle 55 yaşın üstündeki hastalarda antihipertansif tedavide melatoninin tedaviye yardımcı olarak olumlu etkiler meydana getirdiği tespit edilmiştir (59). Eldeki veriler melatoninin kardiyovasküler hastalıklarda antienflamatuar, antioksidan, antihipertansif ve muhtemel antilipidemik fonksiyonları olduğunu ortaya koymaktadır (60).

4.3.Çalışmanın Amacı

Melatoninin SHR'larda ve NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyonda kan basıncını düşürdüğü bilinmekle birlikte, NOS blokajı ve tuz diyeti ile birlikte oluşturulan hipertansiyonda kan basıncına etkisi bilinmemektedir. Literatürde melatoninin hipertansiyonda ki ADMA düzeyleri ile ilgili iki çalışmada farklı HT modelleri (spontan ve renovasküler) kullanılmıştır (61,62). Bu çalışmalarda melatoninin ADMA düzeylerini düşürücü etkisi rapor edilmiştir.

Tuz ve NOS inhibisyonunda ise melatoninin ADMA düzeylerine etkisi ve damar tonusunu nasıl etkileyebileceği (phe kasılma, ach gevşeme cevapları)

bilinmemektedir. Yine melatoninin kontrol ve hipertansiyon oluşturulduğunda, NADPH oksidaz, rho kinaz, hsp90 ve Cav-1 düzeylerine etkisi bizim bilgilerimize göre henüz bilinmemektedir.

Bu çalışmada tuz yklemeı ve NOS inhibisyonu ile oluşturulan hipertansiyonda melatoninin kan basıncı, NADPH oksidaz, rho kinaz, ADMA, hsp90, Cav-1 düzeylerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ek olarak hipertansiyon oluşturulmuş ve farmakolojik tedavi almış ratların aortalarında (in vitro) phe kasılma, ach gevfeme cevapları incelenmiştir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Denekler

Araştırmada 220-260 gr ağırlığında Spraque-Dawley cinsi erkek ratlar (n=21) kullanıldı. Ratlar standart şartlarda (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, havalandırılmalı, sabit ısı odalarda) kafeslerde barındırıldı.

5.2. Deney protokolü

5.2.1. Hipertansiyon oluşturulması

6 hafta boyunca L-NAME ve Tuz uygulaması ile hipertansiyon oluşturuldu.

Tuz, ratların normal diyetlerine ilave olarak %1'lik tuz içeren içme suyu ile 42 gün boyunca verildi.

L-NAME i.p. olarak 40mg/kg/gün dozunda 42 gün uygulandı.

5.2.2. Gruplar

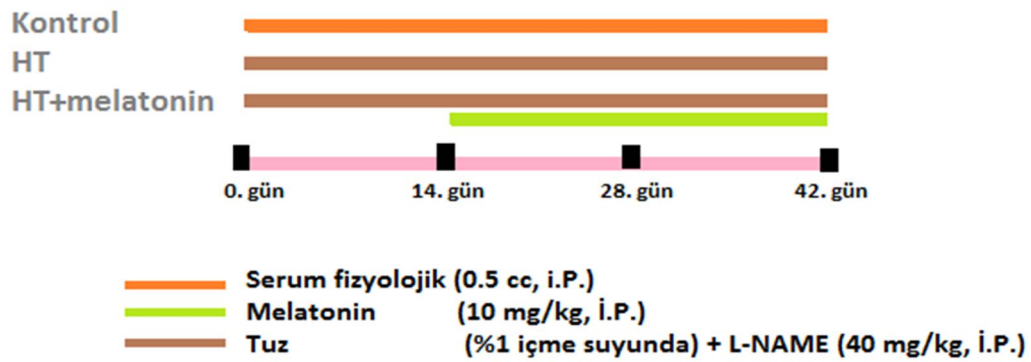
Her bir grupta 7 rat olacak şekilde 3 gruba ayrıldı.

1.Grup: (Kontrol) izotonik (%0,9) NaCl solüsyonu (0,5cc/gün i.p 4 hafta boyunca) i.p. uygulandı.

2.Grup: [Hipertansiyon (HT)] Ratlara 6 hafta boyunca içme suyunda % 1 tuz ve su i.p 40 mg/kg/gün dozda L-NAME verildi. L-NAME izotonik (%0,9) NaCl solüsyonunda çözdürülerek her hayvana 0,5 cc olacak şekilde enjekte edildi. Bu gruptaki ratlara melatonin grubu tedavi süresi olan bir ay boyunca çözücüsü etanol (izotonik içinde %1 konsantrasyonunda 0,5 cc olacak şekilde) verildi. İlaç

solüsyonları hergün taze olarak hazırlandı ve enjeksiyonlar düzenli olarak her gün aynı saatte yapıldı.

3.Grup: (HT+Melatonin) 40 mg/kg/gün dozda L-NAME i.p ve 2. haftadan sonra (14. gün) melatonin 10 mg/kg/gün i.p. 4 hafta verildi. Melatonin saf etanolde çözülerek stok solüsyon hazırlandı. Stoklar deneyin yapıldığı gün hazırlandı. Stok çözeltiler melatonin uygulaması öncesi, (%0,9) NaCl solüsyonu ile sulandırıldı.



Şekil 4. Deney grupları ve uygulanan maddeler

5.2.3. Kan basıncı ölçümleri

Bilinci açık ratların kan basınçları (sistolik kan basıncı) kuyruktan indirekt tail cuff yöntemi ile ölçüldü. (MAY BPHR 9610-PC TAIL-CUFF Indirect Blood Pressure Recorder, Ankara, Türkiye). Tüm gruplardaki ratların kan basıncı ölçümleri 0., 14., 28., ve 42. günlerde yapıldı. Alınan kan basıncı değerleri bilgisayara kaydedildi. Her ratdan 5 ölçüm alındı ve ortalamaları hesaplandı.

5.2.4. Cerrahi uygulamalar

Deney sonunda, denekler dekapite edilerek kan örnekleri alındı. Daha sonra hızlıca abdomen ve toraks orta hattın açıldı. Torasik aorta diafragmanın üzerinden

başlayarak arkus aortaya doğru diseke edilerek çıkarıldı ve soğuk krebs solüsyonu içine alındı. Torasik aorta çevre bağ ve destek dokularından dikkatlice temizlenerek arkusa yakın uçtan 4 mm boyunda halka halinde kesildi.

5.2.5. İn vitro deneyler

Hazırlanan 4 mm boyundaki torasik aorta halkaları, lümeninden birbirine paralel iki paslanmaz çengel geçirilerek içerisinde 37°C'ta ısıtılmış ve %95 O² + %5 CO² karışımı ile gazlandırılan Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu bulunan 10 ml'lik izole organ banyosuna asıldı. Alt çengel izole organ banyosunun tutma kısmına tutturulacak üst çengel de izometrik kasılma cevaplarını kaydetmek için force-displacement transducerlerine (FT 0.03) bağlandı. Kayıtlar BIOPAC marka (Model MP36) poligrafi yapıldı. İzole organ banyosuna asılan torasik aorta halkaları 2 gramlık istirahat gerimi altında 1 saat boyunca dengelendi. İzole organ banyosundaki Krebs-Ringer bikarbonat solusyonu metabolik son ürünlerin birikimini önlemek için her 15 dakikada bir taze solusyonla yenilendi. İn vitro torasik aorta çalışmaları endotel varlığında çalışıldı.

5.2.5.1. Fenilefrin kasılma cevapları

Aortik halkalarda artan konsantrasyonda fenilefrin (10^{-9} - 10^{-4} mol/L) uygulamasına kasılma cevapları değerlendirildi.

5.2.5.2. Asetilkolin gevşeme cevapları

Artan dozlarda fenilefrin uygulamasıyla elde edilen eğriden submaximal doz belirlendi. Sonrasında submax fenilefrin dozu ile kasılma yapıldıktan sonra

artan konsantrasyonda (10^{-9} - 10^{-5} mol/L) asetilkolin uygulamasıyla doz bağımlı gevşeme cevapları alındı.

5.2.6. Genetik analizler

Damar örnekleri etrafındaki bağ dokuları temizlendikten sonra hızlı bir şekilde RNA later solüsyonu içeren 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı. +4°C'de 1 gece bekletildikten sonra RNA izolasyonu yapılmaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

5.2.6.1. RNA İzolasyonu

1. Yaklaşık olarak 50-100 mg olan dokular RNA later solüsyonu içerisinde çıkartılarak kurutma kağıdı arasına alınıp hafifçe bastırılarak RNA later solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml Trizol reaktifi içeren 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı ve steril çelik bilyeler kullanılarak homojenizasyon cihazında homojenize edildi.

2. Homojenize edilmiş örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Santrifüjde 12000x g'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım yeni tüpe transfer edildi.

3. Üzerine 0.2 ml kloroform ilave edilerek vortekslendi ve 2-3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

4. Örnekler, 15 dakika ve +4°C'de 12000xg'de santrifüj edildi.

5. Üst faz, yeni bir tüpe transfer edildi ve üzerine 0.5 ml izopropil alkol eklendi. Örnekler, 10 dakika 15-30°C'de inkübe edildi ve +4°C'de 10 dakika 12000xg'de santrifüj edildi.

6. Süpernatant kısım tamamen uzaklaştırıldı. RNA pelleti, ilk olarak 1 ml %75'lik etanol ile yıkandı. +4°C'de 5 dakika için 7500xg'de santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi tekrarlandı ve kalan tüm etanol uzaklaştırıldı.

7. RNA pelleti 5-10 dakika havada kurutma işlemine tabi tutuldu.

8. DNase/RNase içermeyen su ile sulandırıldı ve cDNA elde edilinceye kadar -80°C'de saklandı.

5.2.6.2. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

İzolasyonu yapılan RNA'ların miktarı Qubit cihazı (Invitrogen, Carlsbad, CA) kullanılarak ölçüldü. Kontrol, HT ve Melatonin olmak üzere oluşturulan 3 grup için Qubit ile ölçülen değerlere göre eşitleme yapılarak 3 RNA havuzu oluşturuldu.

5.2.6.3. cDNA Sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi High Capacity cDNA sentez kiti kullanılarak toplam hacim 20 µl olacak şekilde gerçekleştirildi.

5.2.6.4. Real Time-PCR

Elde edilen cDNA'lar, GAPDH (Housekeeping gen), Rho kinaz, NADPH, Hsp90 ve Cav-1 gen ekspresyonlarını araştırmak için Tag Man Ekspresyon Assay'leri (Invitrogen, Carlsbad, CA) kullanılarak, ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) cihazında çalışıldı. 3 gruptaki ilgili 4 genin ekspresyonları $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri kullanılarak karşılaştırıldı.

5.2.7. Biyokimyasal analiz

5.2.7.1. ELISA

Serum ADMA düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. Deneklerden elde edilen serum örneklerinden ADMA kiti ile ticari firmaca (Eastbiopharm, Cat No: CK- E90206, Ref: E2012 1120049, lot: 20121120) belirlenen protokol uyarınca ölçüm yapıldı.

5.3. İstatistiksel analiz

Elde edilen veriler ortalama±standart hata (SH) olarak belirtildi. Ortalamalar arasındaki farkların istatistiksel anlamlılık düzeylerini belirlemek için spss paket istatistik programı kullanıldı. İstatistiksel farkların değerlendirilmesinde Kruskal Wallis sonrasında Mann Whitney U testi kullanıldı. Elde edilen sonuçların yorumlanmasında $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5.4. Kullanılan Kimyasallar

Fenilefrin, Asetilkolin, L-NAME, Melatonin, (Sigma Aldrich Inc. St. Louis, MO. A.B.D) satın alındı.

6.BULGULAR

6.1. Kan basınçları

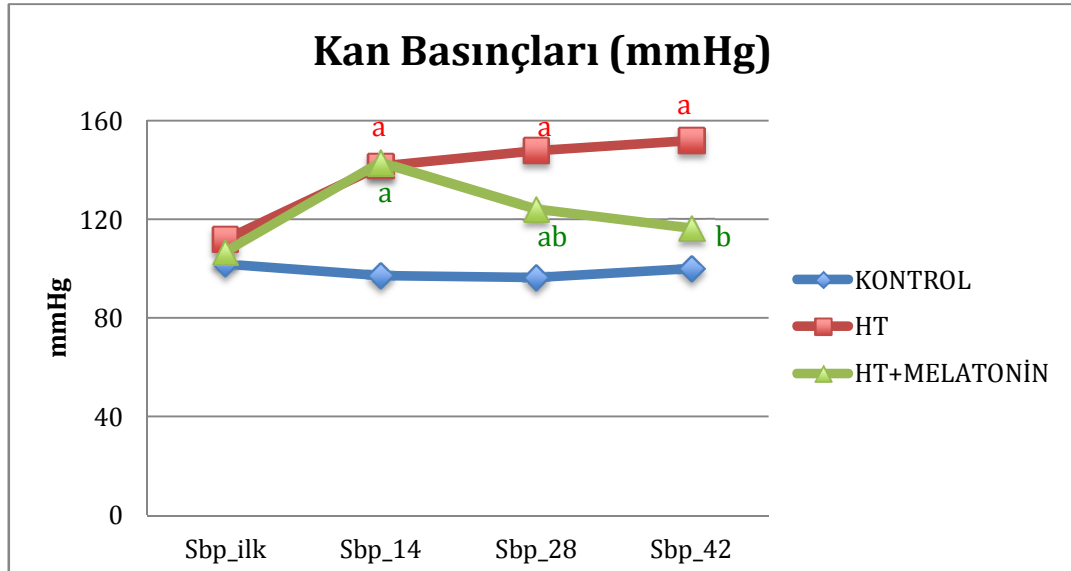
Çalışmamızda, kan basınçları, L-NAME ve tuz uygulanan grupta 14. ve 28. ve 42. günde kontrol grubuna göre anlamlı yüksekti. Melatonin alan grupta 14.günde 143,14±3,76 mmHg olan kan basıncı değerleri tedavinin son günü olan 42. günde 116,43±3,89 mmHg'ye kadar anlamlı bir düşüş gösterdi (Tablo 1, Şekil 5).

Tablo 1. 0., 14., 28. ve 42. günlerde kan basıncı değerleri

Gruplar	0.gün	14.gün	28.gün	42.gün
Kontrol	101,77±3,34	97,33±0,84	96,50±0,92	100±1,41
HT	111,71±2,93	141,63±8,34 ^{ac}	147,71±1,97 ^a	151,90±7,53 ^a
HT+Melatonin	106,93±2,50	143,14±3,76 ^{ac}	124,11±5,92	116,43±3,89

Veriler ort ±SHolarak ifade edilmiştir.

a, Kontrol grubuna göre; b, HT grubuna göre; c, grup içi 0. güne göre; d, grup içi 14. güne göre anlamlı farklılığı göstermektedir, p<0,05.

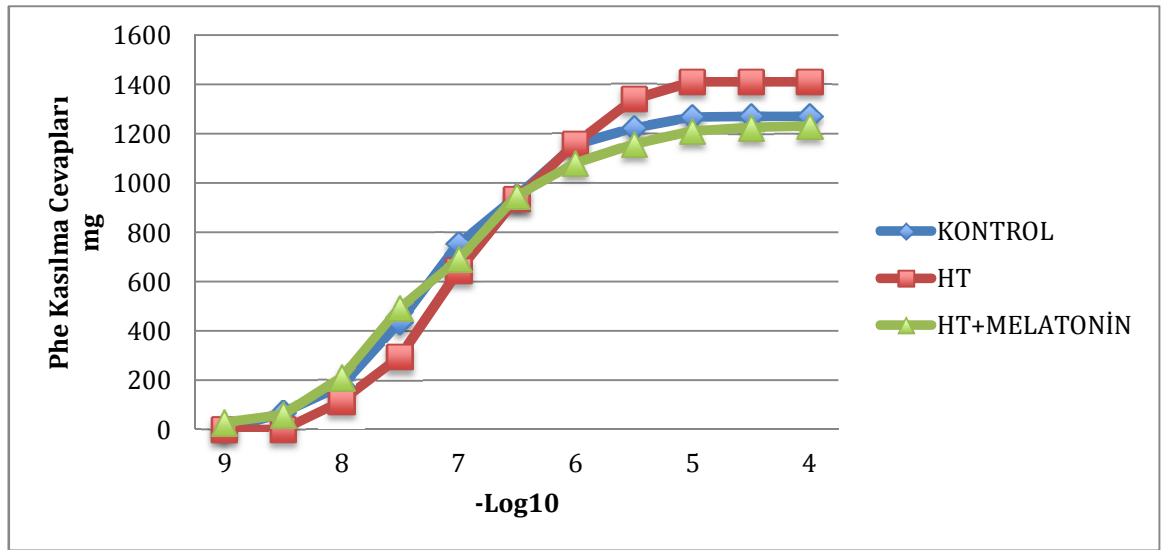


Şekil 5. 0., 14., 28., 42.günlerde kan basıncı değişimleri a, Kontrol grubuna göre; b, HT grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir, p<0,05.

6.2. Torasik aortada kasılma-gevşeme cevapları

6.2.1. Fenilefrin kasılma cevapları

Artan konsantrasyonlarda fenilefrin uygulamasına karşı elde edilen torasik aorta kasılma yanıtları arasında fark bulunmadı. Aynı zamanda Emax ve Ec50 değerleri arasındada istatiksel olarak anlamlı fark yoktu (Şekil 6, Tablo 2).



Şekil 6. Fenilefrin Doz Cevap Eğrisi

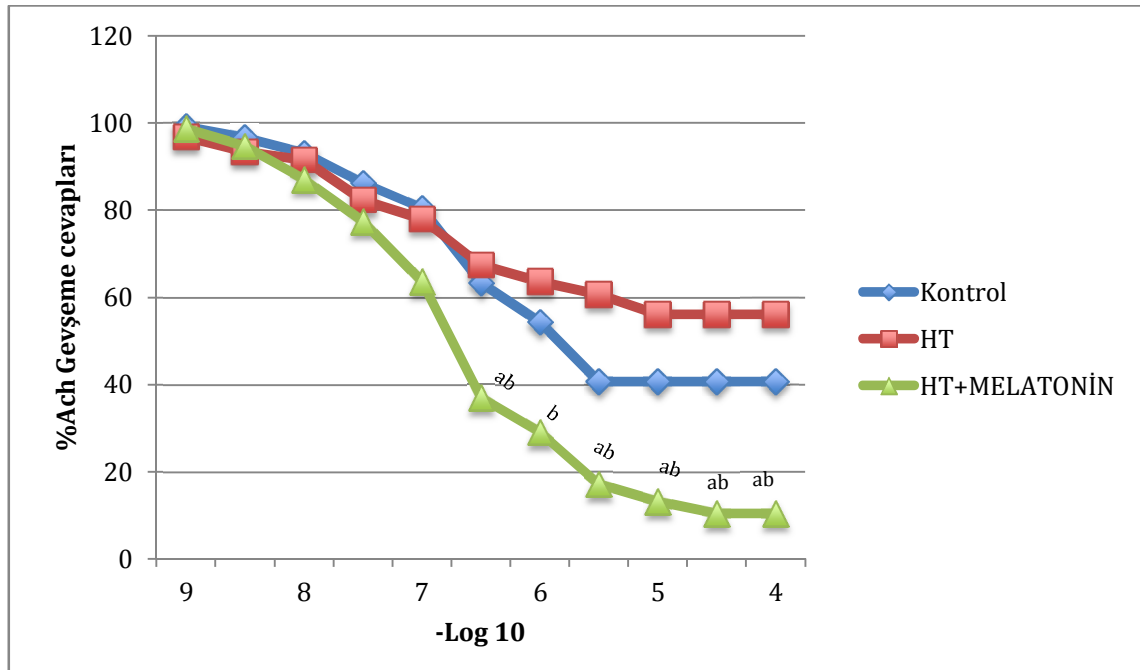
Tablo 2. Fenilefrin Kasılma Cevapları

Dozlar(mol/L)	Kontrol	HT	HT+melatonin
10^{-9}	0	0	28,0±9,56
5.10^{-9}	67,5±47,14	0	59,75±20,2
10^{-8}	175,75±76,87	114,0±89,71	210,50±71,8
5.10^{-8}	438,00±203,26	293,33±177,44	494,0±164,93
10^{-7}	753,75±122,61	644,33±319,13	691,75±211,86
5.10^{-7}	947,75±104,19	935,62±321,61	947,5±182,09
10^{-6}	1156,2±113,58	1158,7±220,18	1081,0±165,35
5.10^{-6}	1224,5±121,97	1341,0±148,89	1160,2±115,9
10^{-5}	1267,2±137,06	1412,0±100,50	1211,2±122,87
5.10^{-5}	1270,5±139,42	1412,0±100,5	1226,0±120,58
10^{-4}	1270,5±139,42	1412,0±100,5	1231,5±118,904

Veriler ort ±SH olarak ifade edilmiştir.

6.2.2. Asetilkolin gevşeme cevapları

Torasik aortada submaksimal doz phe kasılması sonrası artan dozlarda Ach uygulamasına gevşeme cevapları Şekil 7 ve Tablo 3 de, bu değerlerden elde edilen Emax ve Ec50 değerleri Tablo 4 de verilmiştir. Melatonin grubunun aortik Ach gevşeme cevaplarında Emax değerlerinde kontrol ve hipertansiyona göre anlamlı artışa neden olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Ec50 değerinde ise melatonin grubunda diğer gruplara göre farklılık gözlenmedi. 10^{-6} mol dan artan konsantrasyonlarda ach eklenmesiyle ach gevşeme yüzdelерinde hipertansiyon ve kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlendi (Şekil 7, Tablo 3).



Şekil 7. Asetilkolin Doz Cevap Eğrisi

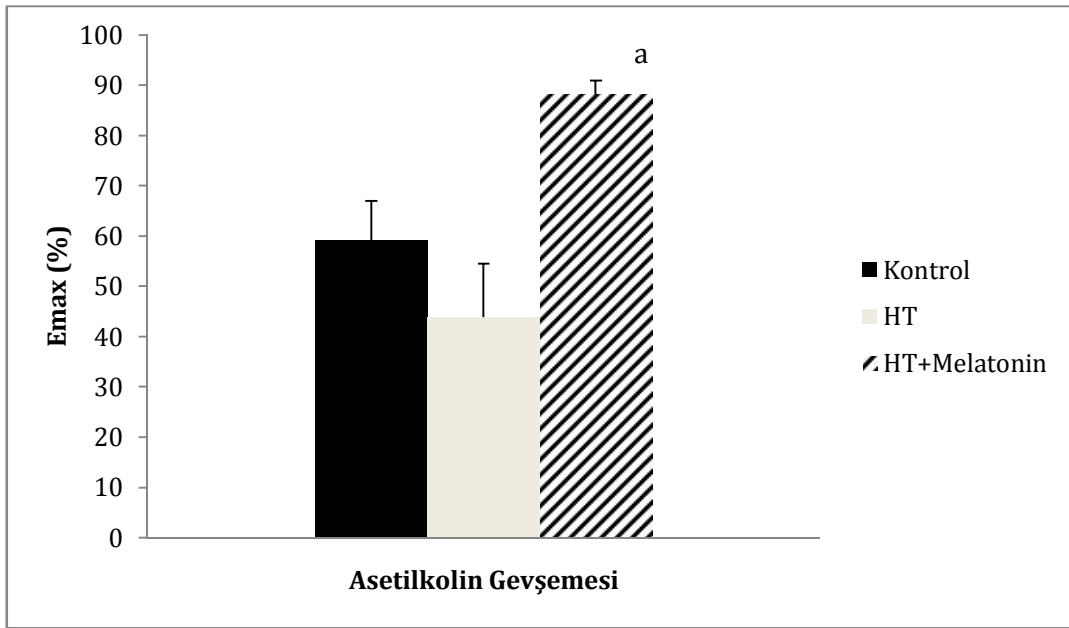
a, Kontrol grubuna göre; b, HT grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir, $p<0,05$.

Tablo 3. Asetilkolin Gevşemesi Emax ve Ec50 değerleri

Dozlar	Kontrol	HT	HT+melatonin
Emax (%)	59,27±7,75	43,95±10,5	88,24±2,74 ^a
Ec50 (µM)	0,26±0,06	0,45±0,27	0,24±0,12

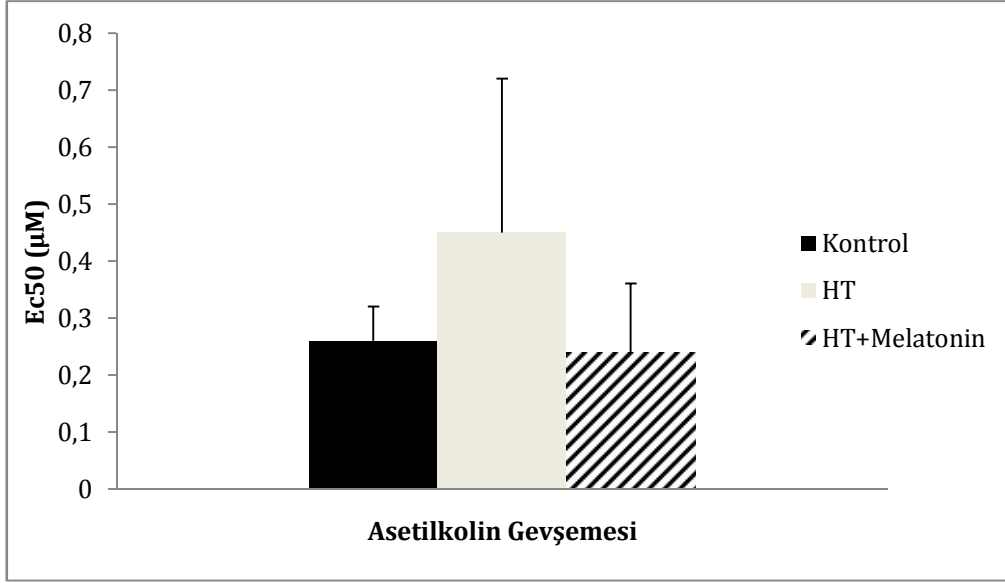
Veriler ort ±SH olarak ifade edilmiştir.

a, HT grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir, p<0,05.



Şekil 8. Asetilkolin gevşemesi Emax yüzde değerleri

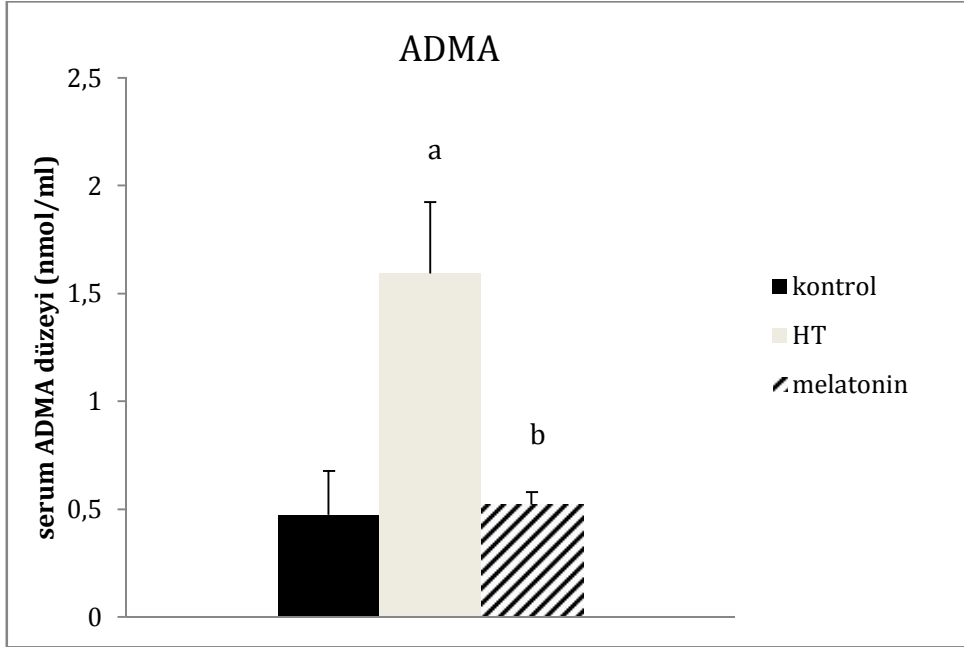
a, HT grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir, p<0,05.



Şekil 9. Asetilkolin gevşemesi EC_{50} (μM) değerleri

6.3. Serum ADMA düzeyleri

Hipertansif grupta serum ADMA düzeylerinde anlamlı artış ve melatonin grubunda ise anlamlı bir azalma görüldü (Şekil 10).



Şekil 10. Serumda ADMA düzeyleri

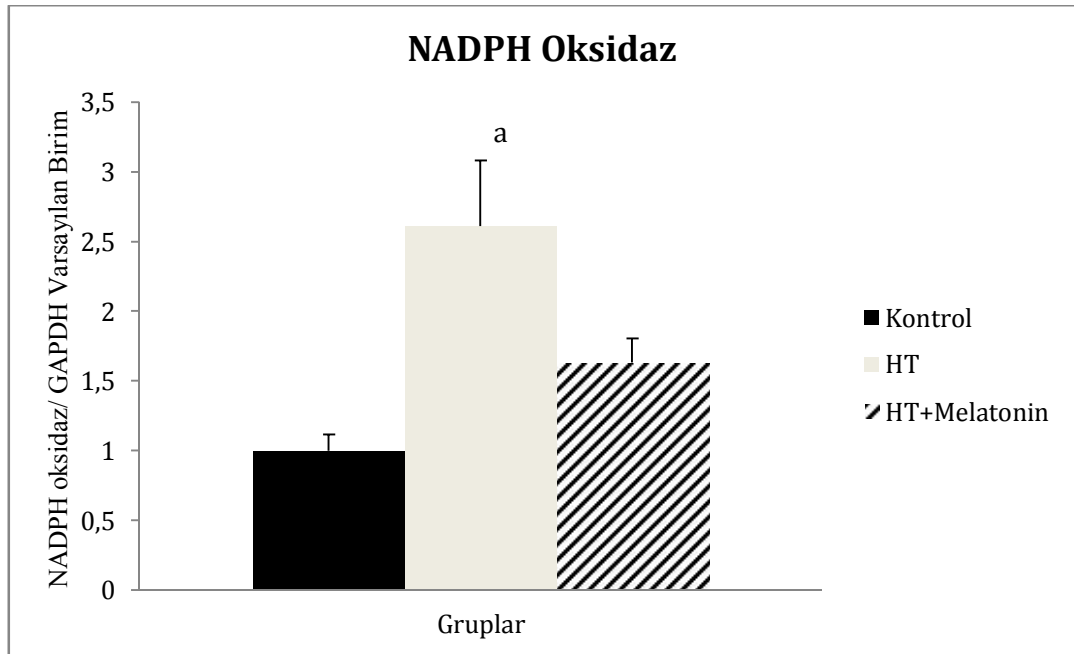
a, kontrole göre; b, hipertansiyona (HT) göre anlamlı farklılığı göstermektedir, $p < 0,05$.

6.4.Aortik dokularda gen ekspresyon çalışmaları

Aortik dokularda NADPH oksidaz, rhokinaz, hsp90 ve Cav-1 ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür.

6.4.1. NADPH Oksidaz ekspresyon düzeyleri

NADPH oksidaz ekspresyon düzeyleri hipertansif grupta anlamlı artma, melatonin alan grupta ise azalma eğiliminde olduğu gözlemlendi (Şekil 11).

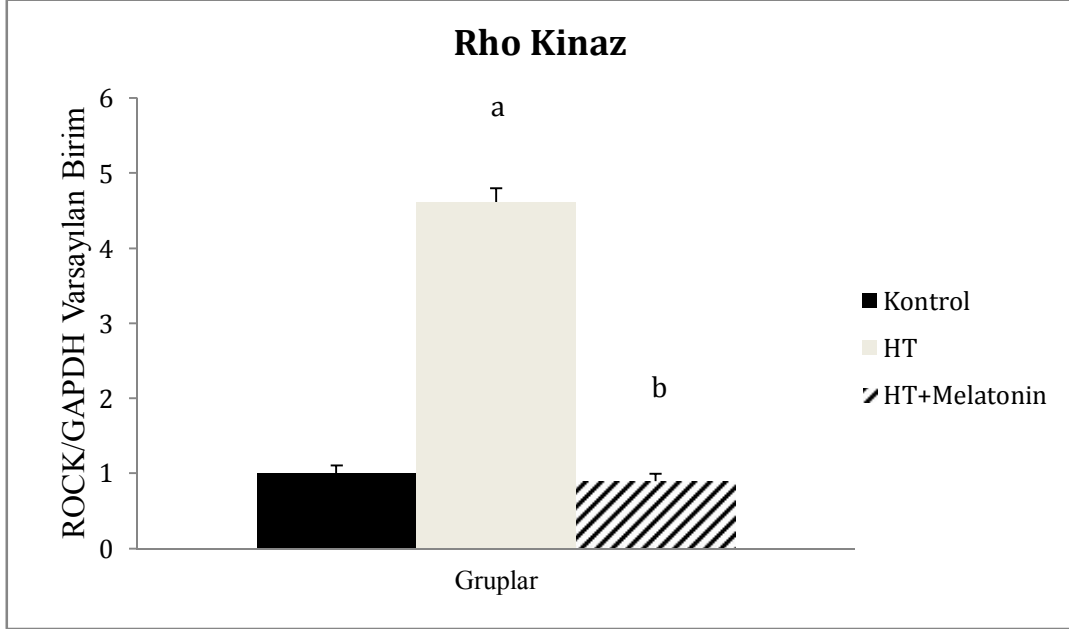


Şekil 11. Aort dokusunda NADPH oksidaz ekspresyon düzeyleri

a, Kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir, $p < 0,05$

6.4.2 Rho Kinaz ekspresyon düzeyleri

Hipertansif grupta rho kinaz ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış ve melatonin grubunda ise anlamlı bir azalma görüldü (Şekil 12).

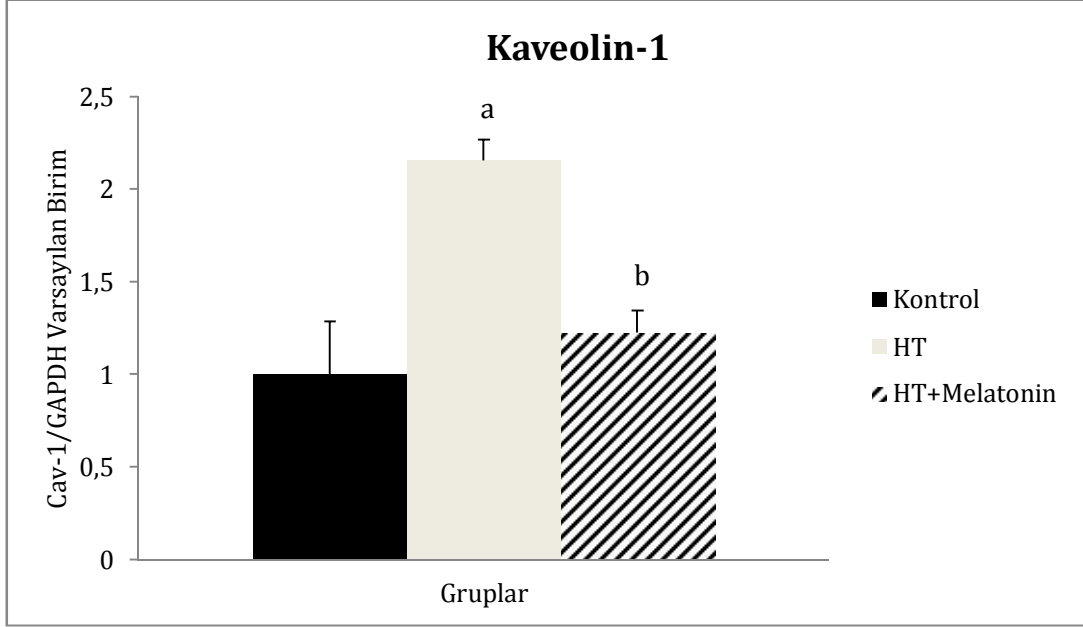


Şekil 12. Aort dokusunda rho kinaz ekspresyon düzeyleri

a, Kontrol grubuna göre; b, melatonin uygulaması ile HT grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir, $p < 0,05$

6.4.3. Kaveolin-1 ekspresyon düzeyleri

Hipertansif grupta ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış görülürken, melatonin grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görünümündedir (Şekil 13).

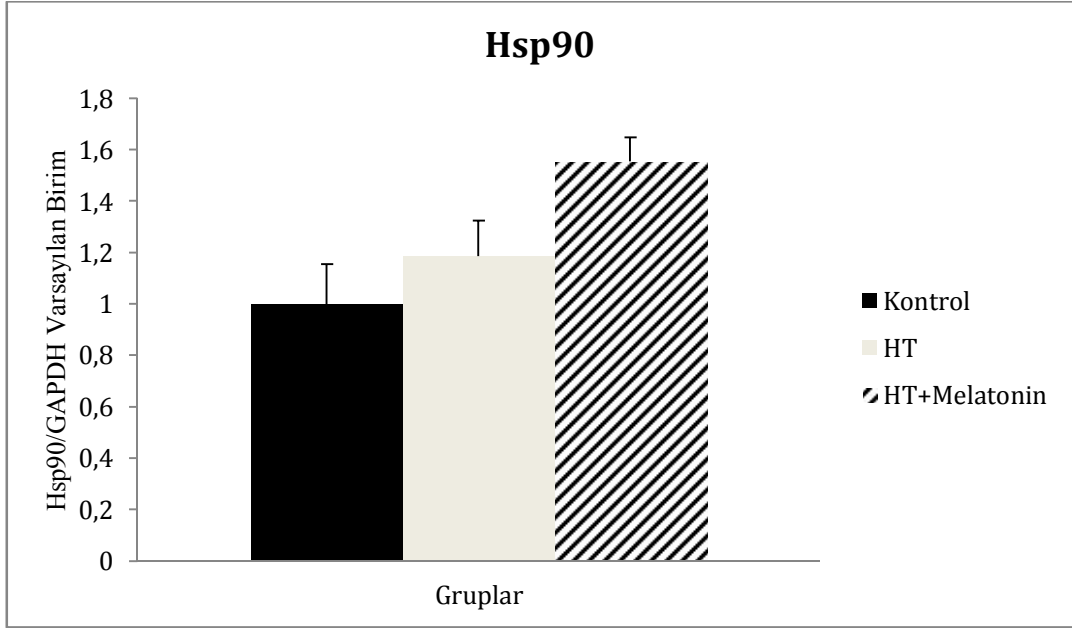


Şekil 13. Aort dokusunda Cav-1 ekspresyon düzeyleri

a, Kontrol grubuna göre; b, HT grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir, $p < 0,05$

6.4.4. Hsp90 ekspresyon düzeyleri

Gruplar arasında hsp90 ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı fark görülmemiştir. Melatonin uygulanmasıyla ekspresyon artma eğilimindedir (Şekil 14).



Şekil 14. Aort dokusunda Hsp90 ekspresyon düzeyleri

7. TARTIŞMA

Çalışmamızda kan basınçları, NOS inhibisyonu ve tuz uygulanan grupta kontrole göre 14., 28. ve 42. günde anlamlı yüksekti. Melatonin uygulanan grupta, 28. ve 42. günde anlamlı düşüktü. Melatonin grubunda, Ach, Emax değerleri, kontrol ve hipertansiyon grubuna göre anlamlı yüksekti. Hsp90 düzeyi ise melatonin uygulaması ile daha artma eğilimi gösterdi. ADMA düzeyi, rhokinaz, NADPH oksidaz ve Cav-1 ekspresyonları hipertansiyonla anlamlı artarken melatonin uygulaması ile rho kinaz haricinde bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı azaldı.

Kan basınçları L-NAME ve tuz uygulaması ile artarken bu artışı melatonin uygulaması geri çevirdi. L-NAME uygulanarak, hipertansiyon modeli oluşturulması (63,64), vasküler remodelling ve endotelial disfonksiyon gelişimi sağlanmaktadır (64-66). Zicha ve ark. (67), 4 ve 12 haftalık Wistar ratlara 4 hafta içme suyu ile 40mg/kg/gün L-NAME uygulamışlar ve hem genç hem de yetişkin ratların sistolik, diyastolik ve ortalama kan basıncı değerlerinin kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yükseldiğini; bu artışın genç ve yetişkin bireylerin kendi aralarında herhangi bir anlamlılık ifade etmediğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada, L-NAME' in 5mg/100 ml dozda uygulanılmasıyla 2 ay sonunda kan basıncının 136 $\pm$ 2 mmHg' a ulaştığı ve hipertansiyon meydana geldiği ve hipertansiyonla birlikte glomeruloskleroz olduğu rapor edilmiştir (68). NOS inhibisyonu sonucu oluşan hipertansiyonda rol oynayan periferik vasküler direnç artışında endoteliumdan kaynaklanan kasıcı faktörlerin katkısı olabileceği düşünülmektedir (69). 10mg/kg dozda 8 hafta derialtı L- NAME uygulaması ile kan basıncının 4. haftaya kadar anlamlı olarak yükseldiği, 5. haftada pik yaptığını ve 8.

haftaya kadar arttığı belirlenmiştir. Kan basıncına ilaveten NADPH oksidaz düzeylerinin arttığı göstermişlerdir (70).

Çalışmamızda, 14 gün L-NAME ve tuz uygulamasının ardından kan basıncında anlamlı artışın sağlandığı ve organ hasarı gelişmesinin henüz başladığı düşünülerek melatonin uygulanmasına başlandı. Melatonin uygulaması, artmış kan basıncını kontrol değerlerine geri çevirdi. Birçok klinik ve deneysel çalışmada bulgularımıza benzer şekilde melatonin uygulamasının kan basıncında düşmeye neden olduğu tespit edilmiştir (7-9,61,71-73). Bu düşüşte direk hipotalamik etki aracılığıyla katekolamin seviyelerinde azalma, aorta düz kasında gevşeme ve antioksidan etkisinin katılımının önemli rol oynadığı belirtilmiştir (73).

Anabilim dalımızda yapılan bir çalışmada; ratlar da 15 günlük L-NAME uygulamasının kan basıncı artışı ile birlikte MDA düzeyini arttırdığı ve GSH düzeyini azalttığı melatonin uygulamasının ise bu etkileri geri çevirdiği gösterilmiştir (50).

Melatoninin hipertansiyon üzerine etkilerinin incelenildiği bir çalışmada (74), kronik melatonin uygulamasının SHR' da arteriyel kan basıncını azalttığı ve mezenterik arterlerinde endotelyum bağımlı gevşeme cevaplarını arttırdığı gösterilmiştir. Organ banyosuna yüksek konsantrasyonlarda eklenen melatoninin SHR ve WKY ratlarda mezenterik arterlerin α -1 adrenerjik reseptörünün aktivasyonu ile meydana gelen vazokonstriksiyonu inhibe ettiği belirtilmiştir (74). Wang ve ark (75) , in vitro 1 mmol/l melatonin uygulanması ile aortik dokulardaki nörepinefrin indüklü kasılma cevaplarının SHR ve WKY ratlarda anlamlı olarak azaltıldığını göstermiş ve SHR'de WKY'ye göre kasılma cevaplarında ki düşüş daha belirgin bulunmuştur. Lopez ve ark., (76) akut 100 mg i.v L-NAME

uygulanmış ve 3 gün boyunca oral 60 mg /kg L-NAME uygulanmış ratlardan elde edilen aortik halkalarda fenilefrin indüklü kasılma cevaplarında artış belirlemişlerdir. Çalışmamızın fenilefrin kasılma cevaplarında, kontrol ve hipertansiyon grupları arasında bir fark görülmemiş olup 4 hafta melatonin uygulaması da fenilefrin indüklü kasılmaları etkilememiştir.

Bizim bulgularımıza benzer şekilde SHR’de yapılan başka bir çalışmada ise nörepinefrin indüklü kasılma cevaplarında kontrol ve hipertansif grup arasında bir fark görülmemiştir (77). Kalkolvalkama ve ark., (78) yapmış oldukları çalışmada içme suyu ile 4 hafta L-NAME verilen gruba kontrol grubu arasında noradrenaline verilen kasılma cevapları arasında fark belirlenmemiştir.

Çalışmamızın asetilkolin gevşeme cevapları ise; melatonin uygulanan grupta, hipertansiyon ve kontrol grubuna göre anlamlı yüksek çıkmıştır. Benzer başka bir çalışmada (79), melatonin uygulamasının mezenterik arterde ve aortada asetilkolin bağlı gevşeme cevapları SHR’ın , WKY ‘a göre daha az hassas olduklarını ortaya konmuş ve SHR’ lerde asetilkolin gevşeme cevaplarının azaldığı rapor edilmiştir. Paulis ve ark., (71) melatoninin, L-NAME uygulanan hipertansif grubun femoral arterinde, asetilkolin indüklü gevşeme cevaplarını etkilemediğini rapor etmişlerdir. Rezzani ve ark., (80) SHR larda melatoninle tedavi alan gruba almayan gruba göre asetilkolin indüklü vazodilatasyon cevabının mezenterik arterde iyileştiğini bildirmişlerdir. Bu bulgular, melatonin uygulamasının damar türüne ya da geliştirilen hipertansiyon modeline göre farklı sonuçlar verebileceğini göstermiştir.

Çalışmamızda melatonin hipertansiyonla artan ADMA düzeylerini, anlamlı seviyede azaltmıştır. Benzer bir çalışmada, Tain ve ark., (61) SHR’de melatoninin

artmış ADMA seviyelerini azalttıklarını göstermişlerdir. Melatonin SHR'larda plazma ADMA seviyelerini düşürerek hipertansiyon gelişimini engeller ve oksidatif stresi azaltır. Safra kanalı ligasyonu yapılmış ratlarda melatonin ADMA'yı yıkan enzim olan DDAH seviyelerini yükselterek ADMA seviyesini düşürmüştür (96). Bu bilgi Melatoninin NO/ROS dengesini NO lehine bozarak kan basıncını azalttığını göstermektedir. Bu koruyucu ve restore edici özellikleri ile prehipertansiyonda tedavi edici olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür.

Biyokimyasal parametreler değerlendirildiğinde, NADPH oksidaz ve ekspresyon seviyelerinde hipertansiyon grubunda kontrole göre anlamlı olarak artış gözlenirken melatonin uygulanması ile azalma eğilimi görülmüştür. Yapılan çalışmalarda hem hipertansiyon hem de diğer oksidatif stresle ilişkili hastalıklarda NADPH oksidaz artışı bildirilmiştir (2). Park ve ark., (81) aldosteron ve tuz indüklü hipertansiyonda aortada NADPH oksidaz aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir. Bizim sonuçlarımızı destekleyen benzer bir çalışmada iki hafta boyunca içme suyuyla L-NAME uygulanmasının aortada NADPH oksidaz seviyelerinin artmasına yol açtığı belirlenmiştir (82). SHR lardan ve fruktoz diyeti almış metabolik sendromlu ratlardan elde edilen kalp dokusunda NADPH oksidaz seviyesinde artış belirlenmiştir (83). Aynı çalışmada hipertansif ratların kalpleri izole lanhgendorf sistemine alınıp iskemi reperfüzyon uygulandığında reperfüzyon sırasında melatonin verilmesinin ventriküler fibrilasyona karşı koruma sağladığı ve ek olarak bu etkinin reperfüzyon sonrasında devam ederek ventriküler taşikardi gibi meydana gelebilecek önemli kardiyovasküler risk faktörlerini azalttığı belirlenmiştir (83). L-NAME ile hipertansiyon oluşturulmuş ratlarda melatonin kardiyak I/R na bağlı nekroz ve oksidatif değişiklikleri azaltmıştır (49). Bu sonuçlar, melatoninin

kardiyovasküler hastalıklarda önemli rol oynayan oksidatif stres ile ilişkili NADPH oksidazı baskılayarak antioksidan etki gösterdiği ve klinikte de önemli etkilerinin olduğunu desteklemektedir.

Rho kinaz, hipertansiyon grubunda anlamlı artarken melatonin grubunda anlamlı azalmıştır. SHR kullanılarak yapılan bir çalışmada Rho/RhoA translokasyonunun vasküler düz kas hücrelerinde iki kat arttığı gösterilmiştir (77). Başka bir çalışmada, renal korteksde RhoA proteininin mRNA seviyelerinin, L-NAME uygulanan SHR’de arttığı görülmüştür (85). Diğer bir çalışmada, aldosteron ve tuz indüklü hipertansif ratlarda rhokinaz inhibitörü fasudil, Rho kinaz ekspresyon seviyelerinin azalmasına neden olmuştur (86). Çalışmamıza benzer şekilde, Kataoka ve ark., (87) 4 hafta boyunca içme suyuyla L-NAME verilmesinin Rho/Rho-kinaz aktivitesinin artmasına neden olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçlar bizim rho kinaz ile ilgili bulgularımızı destekler niteliktedir.

Melatonin rho kinaz etkileşimi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır. Melatoninin kardiyovasküler hastalıklarda rho kinaz enzim aktivitesi etkisi henüz tam olarak ortaya konmamıştır. Yapılan az sayıda çalışmada, melatoninin kanser hücreleri ve yaşlı kobay detrusor kasında rho kinaz aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (88,89). Hipertansiyonla rho kinaz ilişkisi ise ilk kez bu çalışma ile gösterildi.

Cav-1 ekspresyonu çalışmamızda, hipertansiyon grubunda kontrole göre anlamlı artmış olup buna karşın melatonin tedavisiyle anlamlı azalmıştır. Yapılan bir başka çalışmada, SHR ‘de Cav-1 seviyeleri aorta endotelyumunda artmıştır (90). Pojoga ve ark.,(91) L-NAME/ Ang II indüklü kardiyak hasarın kaveolin knockout farelerde wild type e göre azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu sonuca göre L-NAME/

Ang II indüklü kardiyak hasarın mekanizmasında Cav-1'in rol oynadığı düşünülebilir. Melatoninin Cav-1 üzerine etkileriyle ilgili sınırlı sayıda çalışma olmakla birlikte hipertansiyon üzerine etkileri ilk kez bu çalışma ile değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, hsp90 hipertansif grupta artma eğiliminde olmuş olup melatonin uygulanan grupta da anlamlı olmayan ek bir artış görülmüştür. Yapılan araştırmalarda, melatoninin NO yolağını indüklediği (71) ve hsp90 ın eNOS u direk aktive edebildiği (92,93) belirlenmiştir. Buna göre elde ettiğimiz sonuçlar, melatoninin hsp90 üzerinden NO yolağını aktive edebilceğini düşündürmektedir. Hsp90 ile ilgili yapılan çalışmalarda kardiyovasküler hastalıklarda önemli rolü olduğu bildirilmiştir. Catala ve ark., (94) melatoninin adriyamisinin indüklediği hasarda hsp90 düzeylerini azalttığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmamıza benzer sonuçlar gösteren başka bir çalışmada melatoninin human pankreatik karsinom hücrelerinde hsp90 düzeyini arttırdığı tespit edilmiştir (95).

Melatoninin oksidatif stresi azalttığına dair birçok çalışma vardır (44-50). Nava ve ark., (97) SHR' da 6 haftalık melatonin tedavisi oksidatif stresi düşürmüştür. SHR da artma eğilimi gösteren sistolik kan basıncı melatonin tedavisiyle düşme eğilimi göstermiştir. Hücre içi O₂ üretimi ve MDA seviyeleri melatoninle tedavi edilen SHR'da hızlı bir şekilde düşmektedir. NF-kB ekspresyonlarında da anlamlı düşüşler gözlemlenmiştir (97). Benzer bir çalışmada Simko ve Paulis (98), SHR' larda 6 hafta boyunca melatonin tedavisinin kan basıncını düşürdüğünü göstermekle birlikte intersisyal renal dokudaki inflamasyonun azaldığını, oksidatif stresin düştüğünü ve renal NF-Kb ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir. Kronik melatonin tedavisi plazma MDA

ve GSSG:GSH oranını normal seviyelere getirmektedir (98). Pechova ve ark., (99) melatoninin kan basıncını anlamlı olarak düşürdüğünü ve bunu NOS aktivitesini arttırarak, oksidatif stresi azaltarak ve NF-kB yi azaltarak yaptığını öne sürmüşlerdir.

Melatoninin antihipertansif etkisinin, hipotalamus üzerindeki direkt etkisine, antioksidan etkisine, aorta duvarındaki düz kasları gevşetmesine bağlı olarak ortaya çıkabileceği belirtilmektedir (100). Ek olarak, melatoninin sempatik sinir fonksiyonlarını baskılayabildiği, katekolamin salınımının azaltabildiği ve kalp papiller kasında adrenerjik blokaj yapabildiği rapor edilmiştir (101). Melatonin SHR’de hipotansif etkisine, alfa 1 adrenerjik cevabı ve bazal sempatik tonusu azaltmasının aracılık edebileceği gösterilmiştir (74).

Endojen melatonin seviyelerinin kan basıncının düzenlenmesinde ve diğer kalp damar hastalıklarında önemli bağlantıları olduğu düşünülmektedir. Pinealektomi yapılan deneysel modelde melatonin seviyesi düşmüş, vazokonstriksiyon ve hipertansiyon oluşmuştur (8). Yaşlanma ile kalp hastalıkları oranı artarken melatonin seviyesinin yaşla birlikte azaldığı (57), kronik kalp hastalığı olanlarda normal bireylere oranla kan melatonin düzeylerinin anlamlı düşük olduğu rapor edilmiştir (101).

Kalp hastalıklarından kaynaklanan ani ölümlerin sirkadiyen bir ritm gösterdiği bilinmektedir. Bu sirkadiyen ritm dolaşımdaki melatonin düzeyi ile ters yönde bir korelasyon göstermektedir. İskemi ve buna bağlı miyokardiyal elektriksel bozukluklardan kaynaklandığına inanılan ani kardiyak ölümler sabah erken saatlerde çoğunlukla meydana gelmektedir. Bu saatlerde melatonin düzeyi düşüktür. Ani kardiyak ölüm oranı gece yarısında düşüktür, bu saatlerde melatonin

seviyesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (102).

Melatoninin hipertansiyonda, NADPH oksidaz rho kinaz, hsp90 ve Cav-1 düzeylerine etkisi bizim bilgilerimize göre ilk kez gösterilmiştir. İlave olarak tuz diyeti ve NOS inhibisyonunda ise melatoninin kan basıncı, ADMA düzeyleri ve damar tonusuna etkisi ilk kez belirlenmiştir.

Bulgularımız ışığında, ADMA düzeyi ve rho kinaz, NADPH oksidaz ve Cav-1 ekspresyon seviyelerinin kan basıncı yükselmesinde önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Melatoninin kan basıncı düşürücü etkisine; damar Ach gevşeme cevaplarını arttırmasının, damar dokusunda NADPH oksidaz ve rho kinaz, Cav-1 ve serum ADMA düzeylerinin azaltılmasına aracılık edebileceği öngörülmektedir.

Sonuçlarımız melatoninin kan basıncını düşürücü etkisini gösteren klinik ve deneysel çalışmaları desteklemektedir. Yapılan  alışmalar ve bizim bulgularımız melatoninin hipertansiyon tedavisinde önemli koruyucu etkilerinin olabileceğini ve klinik olarak test edilebileceği düşündürmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Sirker A, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Res Cardiol* 2011; 106: 735-747.
2. Kielstein JT, Impraïm B, Simmel S, Bode-Boger SM, Tsikas D, Frolich JC, et al. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004; 109: 172-177.
3. William C Sessa. Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2005:100
4. Ashner L, Foster L. Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 1515–1525.
5. Candice D. Sandra L. Protein complex formation with heat shock protein 90 in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn piglets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*: 2010 1190–1204,
6. Luminita H. Pojoga R. Caveolin-1 Ablation reduces the adverse cardiovascular effects of N-Nitro-L-Arginine Methyl Ester and Angiotensin II. *Endocrinology*, 2010; 151:1236–1246
7. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A. The circadian melatonin rhythm and its modulation: possible impact on hypertension. *J Hypertens* 2009; 27: 17–20.
8. Simko F. Experimental models of melatonin-deficient hypertension. 2013;18: 616-25
9. Kawashima K, Nagakura A, Wurzbürger RJ, Spector S. Melatonin in serum and the pineal of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens A* 1984; 1517–1528.
10. Obayashi K, Saeki K. Nocturnal urinary melatonin excretion is associated with non-dipper pattern in elderly hypertensives. *Hypertension Research*, 2013 doi:10.1038/hr.2013.20
11. Babalık E. Hipertansiyon patofizyolojisi. *Klinik gelişim* 2005; 18: 25-32.
12. Sasaki S, Zhang X-H, Kestelott H. Dietary sodium, potassium, saturated fat, alcohol and stroke mortality. *Stroke* 1995; 26: 783-788.

13. Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res* 1998; 40: 426-32.
14. Puddu P, Puddu GM, Zaca F, Muscari A. Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta Cardiol* 2000; 55: 221-232.
15. Nava E, Luscher TF. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *JHypertens* 1995;13: 39-48.
16. Higashi Y, Oshima T, Ozono R, et al. Effect of L-arginin infusion on systemic and renal hemodynamics in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 1999; 12: 8-15.
17. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997; 48: 489-509.
18. Brecht DS, Synder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 175-195
19. Morton J, Beattie E, Speirs A, Gulliver F. Persistent Hypertension Following Inhibition of Nitric Oxide Formation in The Young Wistar Rat: Role Of Renin And Vascular Hypertrophy. *J Hypertens* 1993; 11: 1083- 1088
20. Kristek F, Gerová M, Devát L, Varga I. Remodelling of septal branch of coronary artery and carotid artery in L-NAME treated rats. *Physiol Res* 45: 329–333.
21. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 2003; 4: 33-40.
22. Boger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* 2004; 134: 2842-28
23. Boger RH, Ron ES. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev* 2005; 10: 14-23.
24. Erbil KK, Y. Yaman, H. Cakır, E. Akgul, O. Caycı, T. Metabolism of asymmetric dimethylarginine and its clinical significance. *Turk J Biochem* 2012; 37: 99-105.

25. Kielstein JT, Impraïm B, Simmel S, Bode-Boger SM, Tsikas D, Frolich JC, et al. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation* 2004; 109: 172-177.
26. Lee MY, Griendling KK. Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1045-1059.
27. Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens* 2004; 22: 535-542.
28. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992; 70: 401-410
29. Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007; 55: 61-75.
30. Rikitake Y, Liao JK. ROCKs as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005; 3: 441-51.
31. Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med (Berl)* 2002; 80: 629-638.
32. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC 1998. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392: 821-824.
33. Shah V, Wiest R, Garcia-Cardena G, Cadelina G, Groszmann RJ, Sessa WC 1999b. Hsp90 regulation of endothelial nitric oxide synthase contributes to vascular control in portal hypertension. *Am J Physiol* 1999; 277: 463-468.
34. Zager RA, Johnson A, Hanson S, et al. Altered cholesterol localization and caveolin expression during the evolution of acute renal failure. *Kidney Int* 2002; 61:1674–1683.
35. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 2001; 293: 2449-2452.

36. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, et al. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 22810–22814.
37. Sahna E, Deniz E, Aksulu HE. Myocardial ischemia-reperfusion injury and melatonin. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2006;6:163-168.
38. Şener G. Karanlığın Hormonu. *Marmara Eczacılık Dergisi* 2010; 14:112-120
39. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, Pawlik M, Sliwowski Z, Cześnikiewicz-Guzik M, Kwiecień S, Brzozowski T, Bubenik GA, Pawlik WW. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol*, 2007; 58: 381-405.
40. Reiter RJ. Neuroendocrine effects of light. *Int J Biometeorol*, 1991; 35: 169-175.
41. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species *J Pineal Res*, 2007; 42: 28-42.
42. Penev PD, Zee PC. Melatonin: a clinical perspective. *Ann Neurol* 1997; 42: 545-553.
43. Dubovich ML. Melatonin receptors: Are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci*, 1995; 16: 50-56.
44. Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2009; 44: 175-200.
45. Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochim Pol*, 2007; 54: 1-9.
46. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 2000; 917: 376-386.
47. Kaçmaz A, User EY, Sehirli AO, Tilki M, Ozkan S, Sener G. Protective effect of melatonin against ischemia/ reperfusion-induced oxidative remote organ injury in the rat. *Surg Today* 2005; 35: 744-750.

48. Sahna E, Acet A, Ozer MK, Olmez E. Myocardial ischemia-reperfusion in rats: reduction of infarct size by either supplemental physiological or pharmacological doses of melatonin. *J Pineal Res* 2002; 33: 234–238.
49. Deniz E, Sahna E, Aksulu HE. Nitric oxide synthase inhibition in rats: melatonin reduces blood pressure and ischemia/reperfusion-induced infarct size. *Scand Cardiovasc J.* 2006; 4: 40 4
50. Sahna E, Deniz E, Karabulut A, Burma O. Melatonin protects myocardium from ischemia-reperfusion injury in hypertensive rats: role of myeloperoxidase activity *Clin Exp Hypertens.* 2008; 30: 26-38.
51. Paskaloglu K, Sener G, Ayangolu-Dulger G. Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in rat aorta and corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol* 2004; 499: 345–54.
52. Lercher P, Stoschitzky K, Sakotnik A, Liebmann P, Klein W. Melatonin in patients with coronary artery disease, hypertensive heart disease and dilated cardiomyopathy. *Atherosclerosis* 2000; 151; 203.
53. Zanoboni A, Forni A, Zanoboni-Muciaccia W, Zanussi C. Effect of pinealectomy on arterial blood pressure and food and water intake in the rat. *J Endocrinol Invest* 1978; 1: 125–30.
54. Nishiyama K, Yasue H, Moriyama Y et al. Acute effects of melatonin administration on cardiovascular autonomic regulation in healthy men. *Am Heart J* 2001; 141: 9–14.
55. Arangino S, Cagnacci A, Angiolucci M et al. Effects of melatonin on vascular reactivity, catecholamine levels, and blood pressure in healthy men. *Am J Cardiol* 1999; 83: 1417–1419.
56. Cavallo A, Daniels SR, Dolan LM, Bean JA, Khoury JC. Blood pressure-lowering effect of melatonin in type 1 diabetes. *J Pineal Res* 2004; 36: 262–6.
57. Campbell A, Sharman E, Age-related differences in the response of the brain to dietary melatonin. *Age (Dordr).* 2013 May 22.
58. Alberto Dominguez R. Myocardial ischemia-reperfusion injury: possible role of melatonin. *World J Cardiol* 2010; 26; 2

59. Lemoine P. Efficacy and safety of prolonged-release melatonin for insomnia in middle-aged and elderly patients with hypertension: a combined analysis of controlled clinical trials. *Integr Blood Press Control*. 2012; 5: 9-17
60. Alberto Dominguez R. Myocardial ischemia-reperfusion injury: possible role of melatonin. *World J Cardiol* 2010; 26: 2.
61. Tain YL, Huang LT. Melatonin prevents hypertension and increased asymmetric dimethylarginine in young spontaneous hypertensive rats. *J Pineal Res*. 2010; 49: 390-398.
62. Erşahin M, Sehirli O. Melatonin improves cardiovascular function and ameliorates renal, cardiac and cerebral damage in rats with renovascular hypertension. *J Pineal Res*. 2009; 47: 97-106.
63. Ribeiro MO, Antunes E, de-Nucci G, et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992; 20: 298–303.
64. Simko F, Luptak I, Matuskova J, et al. L-arginine fails to protect against myocardial remodelling in L-NAME-induced hypertension. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 362–368.
65. Simko F, Matuskova J, Luptak I, et al. Effect of simvastatin on remodeling of the left ventricle and aorta in L-NAME- induced hypertension. *Life Sci* 2004; 74:1211–1224.
66. Peotta VA, Vasquez EC, Meyrelles SS. Cardiovascular Neural Reflexes In L-Name-Induced Hypertension In Mice. *Hypertension* 2001; 38: 555.
67. Zicha J, Pechanova O, Dobesova Z, Kunes J. Hypertensive response to chronic NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) treatment is similar in immature and adult Wistar rats. *Clin Sci (Lond)*. 2003; 105: 483-489.
68. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992; 90: 278-281.
69. Paulis L, Zicha J, Kunes J, et al. Regression of L-NAME- induced hypertension: the role of nitric oxide and endothelium- derived constricting factor. *Hypertens Res* 2008; 31:793–803.

70. Husain K. Interaction of exercise training and chronic NOS inhibition on blood pressure, heart rate, NO and antioxidants in plasma of rats. *Pathophysiology*. 2003; 10: 47-56.
71. Paulis L, Pechanova O, Zicha J, Barta A, Gardlik R, Celec P, et al. Melatonin interactions with blood pressure and vascular function during L-NAME-induced hypertension. *J Pineal Res*. 2010; 48: 102-108.
72. Tain YL, Chen CC, Lee CT. Melatonin regulates L-arginine transport and NADPH oxidase in young rats with bile duct ligation: role of protein kinase *Pediatr Res*. 2013
73. Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2009; 44: 175-200.
74. K-Laflamme A, Wu L, Foucart S, de Champlain J. Impaired basal sympathetic tone and alpha-1 adrenergic responses in association with the hypotensive effect of melatonin in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1998; 11: 219-229.
75. Wang R, Wu L, de Champlain J. Enhanced inhibition by melatonin of alpha-adrenoceptor-induced aortic contraction and inositol phosphate production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1998; 16: 339-347.
76. Ruth M. López, Teresa P, Carlos C. Acute intravenous injection and short-term oral administration of N^G-nitro-L-arginine methyl ester to the rat provoke increased pressor responses to agonists and hypertension, but not inhibition of acetylcholine-induced hypotensive responses. 10.1111/j.1472-8206. 2010
77. Savoia C, Tabet F, Yao G, Schiffrin EL, Touyz RM. Negative regulation of RhoA/Rho kinase by angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells: role in angiotensin II-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2005; 23: 1037-1045.
78. Kalliovalkama J, Jolma P, Tolvanen JP, Kahonen M, Hutri-Kahonen N, Wu X, et al. Arterial function in nitric oxide-deficient hypertension: influence of long-term angiotensin II receptor antagonism. *Cardiovasc Res* 1999; 42: 773-782.

79. Girouard H, Chulak C, Lejossec M, Lamontagne D, de Champlain J. Vasorelaxant effects of the chronic treatment with melatonin on mesenteric artery and aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001;19: 1369-1377.
80. Rezzani R, Porteri E, De Ciuceis C, Bonomini F, Rodella LF, Paiardi S, et al. Effects of melatonin and Pycnogenol on small artery structure and function in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2010; 55: 1373-1380.
81. Park YM, Lim BH, Touyz RM, Park JB. Expression of NAD(P)H oxidase subunits and their contribution to cardiovascular damage in aldosterone/salt-induced hypertensive rat. *J Korean Med Sci*. 2008; 23: 1039-1045.
82. Toba H, Nakagawa Y, Miki S, Shimizu T, Yoshimura A, Inoue R, et al. Calcium channel blockades exhibit anti-inflammatory and antioxidative effects by augmentation of endothelial nitric oxide synthase and the inhibition of angiotensin converting enzyme in the N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertensive rat aorta: vasoprotective effects beyond the blood pressure-lowering effects of amlodipine and manidipine. *Hypertens Res* 2005; 28: 689-700.
83. Diez ER, Renna NF, Prado NJ, Lembo C. Melatonin, given at the time of reperfusion, prevents ventricular arrhythmias in isolated hearts from fructose-fed rats and spontaneously hypertensive rats. *J Pineal Res*. 2013;17:1-7
84. Ramond A, Godin-Ribuot D, Ribaut C. Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. *Fundam Clin Pharmacol*. 2013
85. Koshikawa S, Nishikimi T, Inaba C, Akimoto K, Matsuoka H. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, reverses L-NAME exacerbated severe nephrosclerosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2008 ; 26:1837-1848.
86. Nakano S, Kobayashi N, Yoshida K, Ohno T, Matsuoka H. Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertens Res* 2005; 28: 925-936.

87. Kataoka C, Egashira K, Inoue S, Takemoto M, Ni W, Koyanagi M, et al. Important role of Rho-kinase in the pathogenesis of cardiovascular inflammation and remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Hypertension*. 2002; 39: 245-250.
88. Gomez-Pinilla PJ, Gomez MF, Swärd K. Melatonin restores impaired contractility in aged guinea pig urinary bladder. *J Pineal Res*. 2008.
89. Ortíz-López L, Morales-Mulia S. ROCK-regulated cytoskeletal dynamics participate in the inhibitory effect of melatonin on cancer cell migration. *J Pineal Res* 2009; 46:15-21. doi: 10.1111/j.
90. Suh JW, Choi DJ, Chang HJ, Cho YS, Youn TJ, Chae IH, et al. HMG-CoA reductase inhibitor improves endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats via down-regulation of caveolin-1 and activation of endothelial nitric oxide synthase. *J Korean Med Sci*. 2010; 25:16-23.
91. Pojoga LH, Romero JR, Yao TM, Loutraris P, Ricchiuti V, Coutinho P, et al. Caveolin-1 ablation reduces the adverse cardiovascular effects of N-omega-nitro-L-arginine methyl ester and angiotensin II. *Endocrinology* 2010; 151:1236-46.
92. Young JC, Agashe VR, Siegers K, et al. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 781-791
93. Ramirez-Sanchez I, Aguilar H, Ceballos G, Villarreal F. (-)-Epicatechin-induced calcium independent eNOS activation: roles of HSP90 and AKT. *Mol Cell Biochem* 2012; 370: 141-150.
94. Catalá A, Zvara A, Puskás LG, Kitajka K. Melatonin-induced gene expression changes and its preventive effects on adriamycin-induced lipid peroxidation in rat liver. *J Pineal Res* 2007; 42: 43-49.
95. Leja-Szpak A, Jaworek J. Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *J Pineal Res*. 2010; 49: 248.
96. Tain YL, Hsieh CS, Chen CC, Sheen JM, Lee CT, Huang LT. Melatonin prevents increased asymmetric dimethylarginine in young rats with bile duct ligation. *J Pineal Res* 2010; 48:212–221.

97. Nava M, Quiroz Y, Vaziri N, et al. Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: 447–454
98. Simko F, Paulis L. Effect of melatonin, captopril, spironolactone and simvastatin on blood pressure and left ventricular remodelling in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl* 2009; 27.
99. Pechova L. Effect of melatonin, captopril, spironolactone and simvastatin on blood pressure and left ventricular remodelling in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl* 2009; 27: 5-10
100. Reiter RJ, Maestroni JM. Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation. *J Mol Med* 1999; 77: 36-39.
101. Marktl W, Brogger P, Herold M. Melatonin and coronary heart disease. *Wien Clin Wochenschrift* 1997;109:747-9
102. Muller JE, Ludmer PL, Willich SN. Circadian variation in the frequency of sudden cardiac death. *Circulation* 1987; 75:131-8

9. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Elazığ'da doğdu. 2007 yılında Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun oldu. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. 2007 yılından beri serbest eczacı olarak çalışmaktadır.