

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP PROGRAMI
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MELATONİNİN SIÇAN TİMUS HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
Th1/Th2 DENGESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Zafer ŞAHİN
ELAZIĞ – 2006**

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Necip İLHAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Danışman

Yüksek Lisans Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR

Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ

Prof. Dr. Ahmet GÖDEKMERDAN

Doç Dr. Bayram YILMAZ

Doç. Dr. H. Handan AKBULUT

Kardeşim Gl,
Annem Saniye ve
Rahmetli babam Muzaffer şAHİN'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimime bilgi ve tecrübeleri ile büyük katkıda bulunan, tezimin hazırlanmasında maddi-manevi her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen, Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı, danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Haluk KELEŞTİMUR'a şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince her türlü yardım ve ilgilerini benden esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri, Sayın Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ, Doç. Dr. Bayram YILMAZ, Doç. Dr. Ahmet AYAR, Doç. Dr. Selim KUTLU ve Yrd. Doç. Dr. Oğuz ÖZÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Anabilim Dalımız Doktora öğrencileri, Selvin BALKİ ve Muammer ASLAN'a; Uzmanlık öğrencileri Mehmet AYDIN, Sema TULAY KÖZ, Fatih EROL, Ergül ALÇİN ve Uğur ESEN'e; Yüksek Lisans öğrencileri, Özgür BULMUŞ, Gökçen ÖZDEMİR ve Yüksek Lisans eğitimini tamamlayan Sinan SARAL'a; Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Dr. Mete ÖZCAN'a, Doktora öğrencileri Tuğrul KUZGUN ve İhsan SERHATLIOĞLU'na ve Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Engin YILMAZ'a teşekkür ederim.

Akademik hayata başlamadan önce gerekli altyapı ve bilgi birikimimi edinmemde bana öncülük eden ve maddi-manevi her türlü konularda desteğini esirgemeyen, Keban Meslek Yüksek Okulu Öğretim üyesi, Yrd. Doç. Dr. Yaşar AKAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığımın ilk yıllarında, baş asistanımız olarak, laboratuvar pratiği ve diğer konularda yardım ve ilgisini eksik etmeyen, şuan Karadeniz Teknik

Üniversitesi Tıp Fakóltesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Öğretim Üyesi olarak görev yapan Yrd. Doç. Dr. Sinan CANPOLAT'a teşekkür ederim.

Hücre kültürü ve diğer İmmünolojik teknikler konularında yardımlarını gördüğüm Dr. Süleyman SANDAL'a, ELISA deneyleri için laboratuvarlarını kullanmamıza izin veren, Tıp Fakóltesi İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet GÖDEKMERDAN ve Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Vedat BULUT ile Doç. Dr. H. Handan AKBULUT'a teşekkür ederim.

Şuan için ismi aklıma gelmeyen arkadaşlara ve tezimin sayfalarını karıştırırken benim adıma mutlu olabilen herkese teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ.....	5
3.1. Pineal bez.....	5
3.1.1. Pineal bez ile ilgili tarihi notlar.....	5
3.1.2. Pineal bezin anatomisi.....	6
3.1.3. Pineal bezin histolojik yapısı.....	9
3.1.4. Pineal bezin damarları.....	10
3.1.5. Pineal bezin innervasyonu.....	10
3.2. Melatonin.....	12
3.2.1. Melatoninin keşfi.....	12
3.2.2. Melatoninin biyosentezi ve metabolizması.....	13
3.2.3. Melatonin sekresyonunun düzenlenmesi.....	15
3.2.4. Melatoninin etki mekanizması.....	16
3.2.5. Melatoninin fizyolojik ve fizyopatolojik durumlar üzerine etkisi.....	18
3.2.5.1.Melatoninin antioksidan etkisi.....	18
3.2.5.2.Melatonin-yaşlanma ilişkisi.....	20
3.2.5.3.Melatoninin beslenme davranışı üzerine etkisi.....	21
3.2.5.4.Melatoninin kardiyovasküler sistem üzerine etkisi.....	21
3.2.5.5.Melatoninin anti-kanserojenik etkisi.....	22
3.2.5.6.Melatoninin iskemi-reperfüzyon hasarına etkisi.....	23
3.2.5.7.Melatoninin uyku üzerine etkisi.....	23

3.2.5.8.	Melatoninin endokrin ve üreme sistemi üzerine etkisi.....	24
3.2.5.9.	Melatoninin merkezi sinir sistemi üzerine etkisi.....	25
3.2.5.10.	Melatoninin immün sistem üzerine etkisi.....	27
3.3.	İmmün sistem.....	29
3.3.1.	Sitokinler.....	31
3.3.1.1.	İnterferon-gamma.....	33
3.3.1.2.	İnterlökin-4.....	34
3.3.1.3.	İnterlökin-10.....	35
3.3.2.	T lenfositleri.....	36
3.3.3.	Timus bezi.....	38
4.	GEREÇ ve YÖNTEM.....	40
4.1.	Deney hayvanları.....	40
4.2.	Deney hayvanlarının bakım ve beslenmeleri.....	40
4.3.	Deney protokolü.....	41
4.4.	Anestezi.....	41
4.5.	Pinealektomi operasyonu.....	41
4.6.	Kullanılan kimyasal maddeler ve kitler.....	42
4.7.	Timus hücrelerinin elde edilmesi.....	42
4.8.	Timus hücre kültürünün hazırlanması.....	43
4.9.	İL-4, İL-10 ve İFN- γ seviyelerinin belirlenmesi.....	44
4.9.1.	ELİSA solüsyonlarının hazırlanması.....	44
4.9.2.	ELİSA analiz prosedürü.....	45
4.10.	İstatistiksel değerlendirme.....	46
5.	BULGULAR.....	47

5.1.	İFN- γ sonuçları.....	48
5.2.	İL-10 sonuçları.....	50
5.3.	İL-4 sonuçları.....	52
6.	TARTIŞMA.....	54
7.	KAYNAKLAR.....	61
8.	ÖZGEÇMİŞ.....	78

TABLO LİSTESİ

- Tablo 4.1.** Sıçan yeminin bileşimi.
- Tablo 5.1.** 10 µg/ml Con A içeren ve içermeyen kültür medyumunda, 0 (başlangıç) ve 24 saat sonra kontrole göre İFN-γ seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.
- Tablo 5.2.** 10 µg/ml Con A içeren ve içermeyen kültür medyumunda, 0 (başlangıç) ve 24 saat sonra kontrole göre İL-10 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.
- Tablo 5.3.** 10 µg/ml Con A içeren ve içermeyen kültür medyumunda, 0 (başlangıç) ve 24 saat sonra kontrole göre İL-4 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 3.1.** Sıçanda pineal bezin anatomik konumu.
- Şekil 3.2** İnsanda pineal bezin anatomik konumu.
- Şekil 3.3.** Işık uyarımlarının pineal beze ulaşırken izlediği yol.
- Şekil 3.4.** Melatoninin kimyasal yapısı.
- Şekil 3.5.** Melatonin sekresyonunun düzenlenmesi.
- Şekil 3.6.** Sıçanda timus bezinin anatomik konumu.
- Şekil 3.7.** İnsan timus bezinin çocuk ve erişkinlerdeki görüntüsü.
- Şekil 5.1.A. :** 0 (başlangıç) ve 24 saat sonra kontrole göre Con A ilave edilmemiş sıçan timus hücre kültürlerinin İFN- γ seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.
- Şekil 5.1.B. :** 0 ve 24 saat sonra kontrole göre 10 $\mu\text{g/ml}$ Con A ilave edilmiş sıçan timus hücre kültürlerinin İFN- γ seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.
- Şekil 5.2.A. :** 0 ve 24 saat sonra kontrole göre Con A ilave edilmemiş sıçan timus hücre kültürlerinin IL-10 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.
- Şekil 5.2.B. :** 0 ve 24 saat sonra kontrole göre 10 $\mu\text{g/ml}$ Con A ilave edilmiş sıçan timus hücre kültürlerinin İL-10 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.
- Şekil 5.3.A. :** 0 ve 24 saat sonra kontrole göre Con A ilave edilmemiş sıçan timus hücre kültürlerinin İL-4 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.

Şekil 5.3.B. : 0 ve 24 saat sonra kontrole göre 10 µg/ml Con A ilave edilmiş sıçan timus hücre kültürlerinin İL-4 seviyelerinde meydana gelen değişiklikler.

KISALTMALAR LİSTESİ

AFMK	: N ¹ -asetil-N ² -formil-5-metoksikinüramin
AMK	: N ¹ -asetil-5-metoksikinüramin
APC	: Antijen sunucu hücre
BCSF	: B hücresi büyüme faktörü
BOS	: Beyin-omurilik sıvısı
Con A	: Concanavalin A
DMSO	: Dimetil sülfoksit
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
G6PD	: Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz
GH	: Growth hormon
GM-CSF	: Granülosit Monosit- Koloni stimüle edici faktör
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSH-Rd	: Glutasyon redüktaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HEPES	: N-2-Hidroksi etil piperazin-N'-2-ethan sülfonik asit
HIOMT	: Hidroksiindol-o-metil transferaz
HOCL	: Hipoklorik asit
İFN	: İnterferon
İL	: İnterlökin
LAK	: Lymphokine activated killer
LH	: Lüteinleştirici hormon
MAF	: Makrofaj aktive edici faktör

MCP	: Monosit kemotaktik protein
M-CSF	: Monosit koloni uyarıcı faktör
MHC	: Büyük doku uyum kompleksi (Major histokompatibilite kompleksi)
MT	: Melatonin
NAS	: N-asetil serotonin
NAT	: N-asetil transferaz
NE	: Norepinefrin
NK	: Natural killer
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
ONOO ⁻	: Peroksi nitrit
PBMC	: Perifer mononükleer kan hücreleri
Pnx	: Pinealektomi
PVN	: Paraventriküler nükleus
RHT	: Retino-hipotalamik traktus
ROS	: Serbest oksijen radikalleri
RSA	: Rekürren spontan abortus
SCN	: Suprakiazmatik nükleus
SOD	: Süperoksit dismutaz
SSG	: Superior servikal ganglion
Tc	: Sitotoksik T
TCR	: T hücre resertörü
TGF	: Transforming growth factor
Th	: Yardımcı T

TNF	: Tümör nekroz faktörü
Ts	: Baskılayıcı T
VCAM	: Damar h�creti adhezyon molekülü
5-HT	: Serotonin (5-Hidroksitriptamin)
6-HMS	: 6-Hidroksimelatonin sülfat (6-S�lfatoksimelatonin)

1.ÖZET

İmmün sistem ve melatoninin (MT) ana kaynağı olan pineal bez arasında karşılıklı bir ilişki olduğu ileri sürülmektedir. Farklı hayvan türlerinde MT'nin immünomodülatör etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Ancak MT'nin ve aynı zamanda onun temel kaynağı olan pineal bezin timositlere ve sitokin sekresyonu profiline etkisi iyi anlaşılamamıştır. Bu nedenle, çalışmamızda intak ve sham-pinealektomi'den (Pnx) ibaret olan Pnx yapılmamış grup ve Pnx yapılmış sıçanların timus hücre kültürlerinde T helper 1/T helper 2 (Th1/Th2) lenfosit dengesine MT'nin etkisini araştırmayı amaçladık.

Sitokin üretim profilini belirlemek için deneyler, 10 µg/ml concanavalin A (Con A) ile uyarılmış ve uyarılmamış timositlerde gerçekleştirildi. İnterferon-gamma (IFN-γ) (Th1 hücreleri tarafından üretilir), interlökin (IL)-4 ve IL-10 (Th2 hücreleri tarafından üretilir) seviyeleri, süpernatantlar MT'nin iki farklı konsantrasyonlarıyla (10 ve 100 µM) muamele edildikten, 0 ve 24 saat sonra ölçüldü. IFN-γ seviyesi, Pnx yapılmış sıçanlarda, hem Con A ile uyarılmış hem de uyarılmamış 24 saat medyumlarında anlamlı şekilde arttı. Buna karşın, IL-10 seviyesi ise Pnx'li sıçanların Con A'lı ve Con A'sız gruplarında anlamlı şekilde azaldı. MT'nin 100 µM konsantrasyonu, Pnx'in IFN-γ ve IL-10 seviyelerine olan etkilerini düzeltti ancak, MT'nin 10 µM'lık dozu etkisizdi; kontrol ve MT uygulanmış gruplar arasında IFN-γ ve IL-10 seviyelerinde anlamlı farklılık yoktu.

Sonuçlarımız, Pnx yapılmasıyla sitokin üretim profilinin anlamlı bir şekilde Th1 yönüne doğru kaydığını, MT'nin 100 µM dozunun uygulanmasıyla IFN-γ seviyesinin azalması ve IL-10 seviyesinin artmasının, Th2 baskınlığının bir işareti

olarak kabul edilebileceğini ve bu etkinin doz bağımlı bir şekilde MT ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

2. ABSTRACT

A reciprocal relationship between the pineal gland, the main source of melatonin (MT) and the immune system has been suggested. It has been reported that MT has immunomodulatory actions in different animal species; however, effects of MT and its main source (the pineal gland) on thymocytes and its cytokine secretion profiles are not well-understood. Therefore, we aimed to investigate the effects of MT on the T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) lymphocyte balance in thymocyte cultures prepared from pinealectomized (Pnx) and non-Pnx rats consisting of intact and sham-operated control rats.

The experiments were performed in 10 µg/ml concanavalin A (Con A) stimulated and nonstimulated thymocytes for determination of cytokine production profiles. Interferon-gamma (IFN-γ) (produced by Th1 cells), interleukin (IL)-4 and IL-10 (produced by Th2 cells) concentrations were measured in the supernatants at 0 and 24 h after treatment with two different concentrations of MT (10 and 100 µM). IFN-γ levels increased significantly at 24 h in both Con A stimulated and non-stimulated media prepared from Pnx rats. In contrast, IL-10 levels were significantly reduced at 24 h in the cultures belonging to Pnx rats with and without Con A. While 100 µM concentration of MT adversed the effects of Pnx on IFN-γ and IL-10 levels, the 10 µM dose of MT had no effect. There was no significant differences between the control and MT treated groups in terms of IFN-γ and IL-10 levels.

Our results show that the cytokine production profile was significantly shifted towards Th1 by Pnx and implicate that 100 µM dose of MT treatment can

decrease IFN- γ and increase IL-10, which is regarded as a sign of Th2 dominance.

This finding can be attributed to the dose of MT applied.

3. GİRİŞ

3.1. Pineal bez

3.1.1. Pineal bez ile ilgili tarihi notlar

Çok eski zamanlardan beri varlığı bilinen pineal bez, ilk olarak M.Ö. 300 yılında İskenderiyeli Herophilus (M.Ö. 325-280) tarafından tespit edilmiştir (63). Bergamalı Galen (M.S.130-200), insan beyinde pineal bezi, çam kozalağını andıran şeklinden dolayı, konareion (Latince conarium) olarak isimlendirerek ilk tanımlamayı yapmıştır (12, 122, 134, 259). Bu kelime pineal sinirleri tanımlamak için ‘nervi conarii’ olarak günümüzde de kullanılmaktadır. Andreas Vesalius Bruxellensis (1514-1564), pineal bezin topografik yapısını dikkatlice inceleyerek, bezin merkezi yerleşimi ve beyinde çifti olmayan bir organ olarak farklılığını ortaya koymuştur (4, 105). Yine Vesalius, bezin aşırı damarlı yapısına dikkat çekmiştir (134). Bütün bunlar pineal bezin, orta çağın ünlü filozof, hekim ve matematikçisi Rene Descartes (1596-1650) tarafından ‘ruhun oturduğu yer’ (12, 122, 173) ve ‘psikofizyolojik fonksiyonları düzenleyen organ’ olarak ifade edilmesine dayanak oluşturmuştur (4, 134). Pineal bez, birçok hayvanda beyin en üst kısmında yer almasından dolayı aynı zamanda servikal cisim (*cervical body*) ve *epiphysis cerebri* gibi isimlerle de anılmıştır (5, 134).

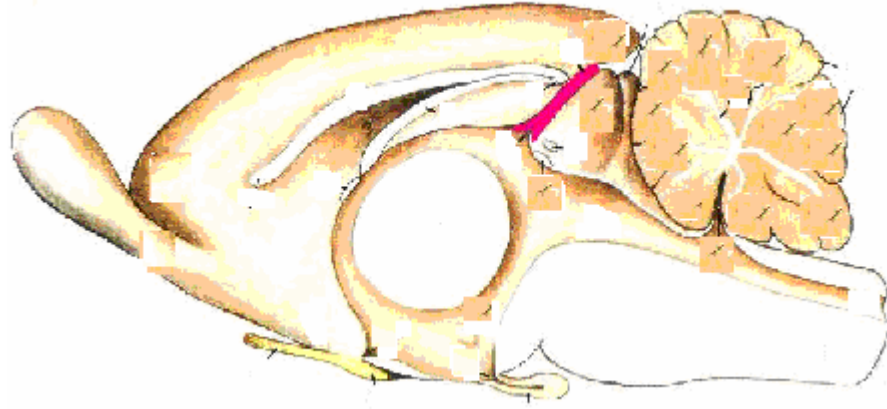
Yeni teknolojilerin gelişmesine bağlı olarak, pineal bezin yapısı ve fonksiyonları hakkında günümüze yansıyan bilgilerin değişmesi üzerine diğer anatomik yapı ve organlarla birlikte pineal beze de çeşitli tanımlamalar getirilmiştir. Örneğin, mikroskopik ve histolojik tekniklerdeki ilerlemeler, daha alt sınıftaki omurgalılarda pinealin ‘üçüncü bir göz’ olarak tanımlanmasına yol

açmıştır (5, 134). Bioassay ilerlemeler, aktif pineal ekstraktların kurbağa derisinin rengini açıcı etkisinin keşfiyle sonuçlanmış (134, 143) ve 1958’de pineal hormonu melatoninin (MT) izolasyonuna rehberlik etmiştir (121, 122, 134). Floresans tekniklerin gelişmesiyle pineal bezdeki MT ve serotonin miktarları ölçülmüş, bu iki maddenin gece-gündüz seviyelerinde büyük değişiklikler görülmüş (134, 192, 193) ve böylece, pineal bezin işlevlerinde aydınlık ve karanlığın rolü olduğu ortaya konulmuştur (12, 134).

3.1.2. Pineal bezin anatomisi

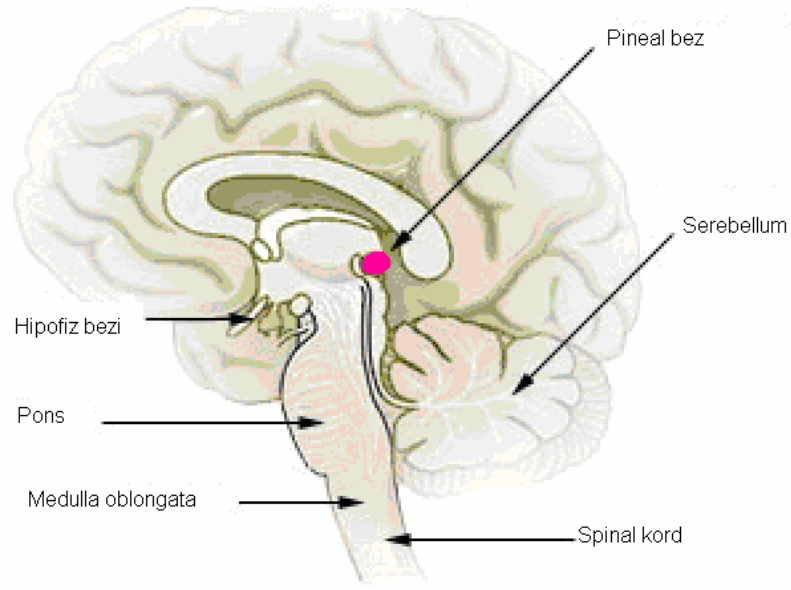
Pineal bez, *corpus pineale*, *glandula pinealis*, *pineapple gland*, *epiphysis cerebri* gibi adlarla da anılmaktadır ve şekil olarak özellikle insanda ananasa veya kozalağa benzemektedir (111, 199). Pineal bez *diencephalic* çatının bir çıkıntısı olarak gelişir (72, 209).

Sıçan pineal bezi *commissura posterior* ile *commissura habenulorum* arasında, 3. ventrikül tavanının arka ucundan başlayan bir sapla beyinciğe doğru uzanır (216). Pineal sap, 100 µm çapında (37) ve 2700-3000 µm uzunluğunda (35) olup, bezi 3. ventrikülün tavanının arka ucuna bağlar (13, 37, 199). Yuvarlağa yakın oval şekilde olan bez, 0.9-1.56 mg ağırlığındadır (13). Sıçan pineal bezine ait ölçümler, transvers 1300-1500 µm, dorso-ventral 750-800 µm, longitudinal (fronto-occipital) 1500-1600 µm olarak bulunmuştur (35).



Şekil 3.1. Sıçanda pineal bezin anatomik konumu (190)

İnsan pineal bezinin anatomik ilişkileri sıçan dahil diğer memeli türlerle aynıdır (199). Boyutu ve pozisyonu aynı türdeki canlılarda bile farklılık gösterebilir (13). İnsanda, pineal bez prenatal gelişimin 36. gününde (65, 117), *commissura posrerior* ile *commissura habenulorum* arasında, *diencephalon* tavanının arka bölümündeki *neuroepithelium*'un divertikülü şeklinde gelişmeye başlar (65, 117, 199, 214). Erişkin insanlarda ağırlığı 100-180 mg arasında değişmekle birlikte, ortalama ağırlığı 130-140 mg olarak kabul edilmektedir. Bezin uzunluğu 5-9 mm, genişliği 3-6 mm ve kalınlığı 3-5 mm arasındadır (199). Vücut ağırlığına oranı, diğer türlerle karşılaştırıldığında, insanda küçük bir orana sahip olduğu görülür (13).



Şekil 3.2. İnsanda pineal bezin anatomik konumu (9).

Pineal bez kemirici türü memelilerde yüzeysel ve derin pineal bez olmak üzere iki kısımdır (72, 99, 199, 209). Bezin büyük bir kısmı dorso-caudal yönde yüzeysel pineal şekline dönüşmüş, küçük bir kısmını oluşturan derin pineal ise 3. ventriküle yakın şekilde yerleşmiştir. Her iki kısım da pineal sap ile birleştirilmiştir. Yüzeysel pineal olarak anılan kısmı yoğun bir damar ağına sahiptir ve buradaki pinealositlerde sentezlenen MT bu damar ağına salınır. Bununla birlikte derin pineal olarak anılan kısmında ise gece-gündüz ritminde MT sentezleyici enzim için kodlayıcı genleri içeren fonksiyonel pinealositler mevcuttur (72, 209). İnsanlar ve diğer memelilerde ise pineal bez tek kısımdan oluşur (99, 199). Pineal bez memelilerde sekretuar, balıklarda ve amfibilerde fotoreseptif, sürüngenlerde ve kuşlarda ise hem fotoreseptif hem de sekretuar fonksiyonları üstlenmiş bir organdır (13).

3.1.3. Pineal bezin histolojik yapısı

Subaraknoid aralıkta yer alan *corpus pineale*, sap bölümü dışında piameter ile sarılıdır. Kapsül görevi yapan piamaterden birçok kan damarı içeren ince bağ doku bölümleri organ içerisine nüfuz ederek, bezi düzensiz lobullere ayırır (65, 117, 214). Kan damarlarını içeren *stroma* dokusu *mezenşim*’den gelişir (199, 216).

Pineal bez, parenkimal ve interstisyel hücreler olmak üzere iki hücre grubundan oluşur (35, 36). *Neuroepithelial* hücreler çoğalarak *pinealoblastları* oluşturur, bunlar da *parenkim* hücrelerine dönüşür (199, 216). Parenkim hücrelerine pinealosit adı verilir. Bu hücreler, aynı zamanda bezin sekresyon fonksiyonundan sorumludur (35, 36, 63, 104, 214). Pinealositlerin pineal bez içindeki oranı %90’a ulaşır ve bu hücreler aşağı sınıf omurgalılarda fonksiyonel ışık reseptörleridir. Retinanın koni hücreleriyle benzerlik gösterirler ve ışık enerjisini elektriksel sinir uyarısına dönüştürürler. Memelilerde ise pinealosit hücresi ışık uyarısına direkt olarak değil, salgı fonksiyonu ile çeşitli hedef bölgelerde karmaşık ve çok nöronlu düzenleyici bir ara istasyon vazifesi görerek yanıt verir. Birçok memeli türünde tek tip pinealosit hücresi tanımlanmış olmasına karşın, insan dahil bir grup memelide, tip 1 ve tip 2 olarak iki tip pinealosit hücresi tanımlanmıştır. Pinealositlerden başka pineal bez içinde bulunan en önemli hücre topluluğu glia hücreleridir. Bunların bez içindeki oranı %5-10 arasında değişmektedir (35, 36). Pinealositler tip 1, glia hücreleri de tip 2 pinealosit olarak da isimlendirilirler (63, 104, 214). Ayrıca plazma hücreleri, mast hücreleri (34, 36, 63, 99), fibrositler, lenfositler, düz kas fibrilleri (63, 99), pigment içeren hücreler, çizgili kas dokusu ve sinir hücreleri de pineal bez içerisinde bulunurlar (34, 36).

Pineal bezin sap kısmında ise seyrek olarak pinealositler, glia hücreleri ve miyelinsiz sinir lifleri bulunur (36).

3.1.4. Pineal bezin damarları

Pineal bez küçük yapıda olmasına rağmen, endokrin organlar içinde, kan akımı yönünden 4 ml/dak/gr'lık değerle böbreklerden sonra ikinci sırada gelmektedir (79, 99, 104, 199).

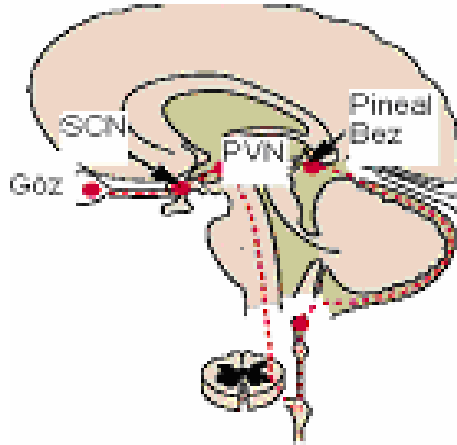
Pineal bezin arteriyel beslenmesi a. cerebri posteriordan kaynaklanan a. choroidea posterior'un medial dalları aracılığıyla gerçekleşmektedir (63, 199). Beze gelen arteriyel dallar kapsulada birçok arteriollere ayrılarak organ içerisine nüfuz eder ve bağ doku bölümlenmelerine uyacak şekilde parankimaya dağılır (199). Venöz drenajı ise, v. cerebri magna ya da v. cerebri interna tarafından sağlanır (63, 199). Pineal bezde kan beyin bariyeri yoktur (199, 251). MT, üretimini takiben basit difüzyon ile sekrete edilir (156, 199).

3.1.5. Pineal bezin innervasyonu

Pineal bezin endokrin aktivitesi, çoğu endokrin organdan farklı olarak önemli derecede sinirsel innervasyona bağlıdır. Gözler tarafından çevrenin ışık veya karanlık olduğuna ilişkin duyuşal bilgilerin alınması, pineal bezden MT salgılanmasının düzenlenmesinde başlıca öneme sahiptir. Genel olarak ışık MT üretimini azaltırken, karanlık artırır (104, 199, 200).

Işık uyarısı pineal beze karmaşık, çok nöronlu bir sistemle ulaşır. Retinadan başlayan nöral yolun birinci kısmı retinohipotalamik traktus'dur (RHT). Retinal ışık reseptörleri ışığı elektriksel uyarıya çevirerek monosinaptik olarak

suprakiazmatik çekirdeğe (SCN) iletir (47, 63, 199). RHT, hipotalamusun anterior kısmındaki SCN’de sonlanır. Burada sinaps oluşturdktan sonra, lifler hipotalamusun paraventriküler çekirdeklerine (PVN) giderler (104, 225). Sinir impulsları daha sonra üst torakal omurilik bölgesinde intermediolateral kordon içinde taşınır (104, 231). Bu pregangliyonik nöronların aksonları omurilikten ayrılır ve sempatik zincirde yukarı doğru giderek superior servikal gangliondaki (SSG) postgangliyonik nöronlarla sinaps oluştururlar (41, 104). Sempatik bir gangliyon olan SSG’den çıkan postgangliyonik adrenerjik lifler ise nervi conarii aracılığıyla baş bölgesine geçer ve pineal bezde sonlanırlar (47, 63, 199)



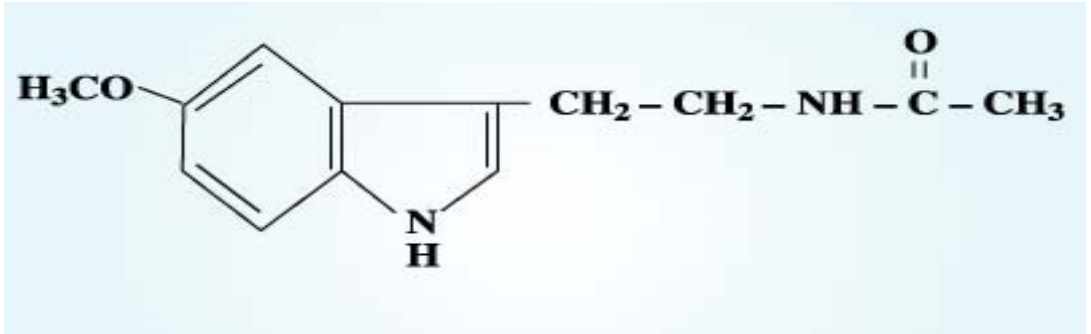
Şekil 3.3. Işık uyarımlarının pineal beze ulaşırken izlediği yol (10).

Pineal bez, sempatik innervasyondan başka az oranda parasempatik ve serotoninerjik sinir lifleri ile de innerve edilir. Bu lifler bezin içinde, çoğunlukla pinealositlerin arasında serbest sinir uçları şeklinde sonlanırlar (38, 149, 199, 201).

3.2. Melatonin

3.2.1. Melatoninin keşfi

Amerikalı dermatolog Aaron B. Lerner ve arkadaşları, 1958’de sığır pineal bezinden, potent maddeyi tanımladı (121, 122) ve bu N-asetil-5-metoksitriptamin yapısındaki maddeye, amfibian pigmentlerindeki melanoforları kontrakte ettiği için MT adını verdi (12, 99). MT, pineal bezin temel hormonu olarak kabul edilmesine rağmen, bu bezden çok sayıda hormon ve/veya hormon benzeri faktörün de salgılandığı tespit edilmiştir (32, 184, 185). Salgılanan endojen maddeler indolaminler ve peptidler olarak iki gruba ayrılmaktadır. İndolaminler içerisinde, 232 molekül ağırlıklı MT (52, 53) ilk sırada gelmektedir. (Şekil 3.4)

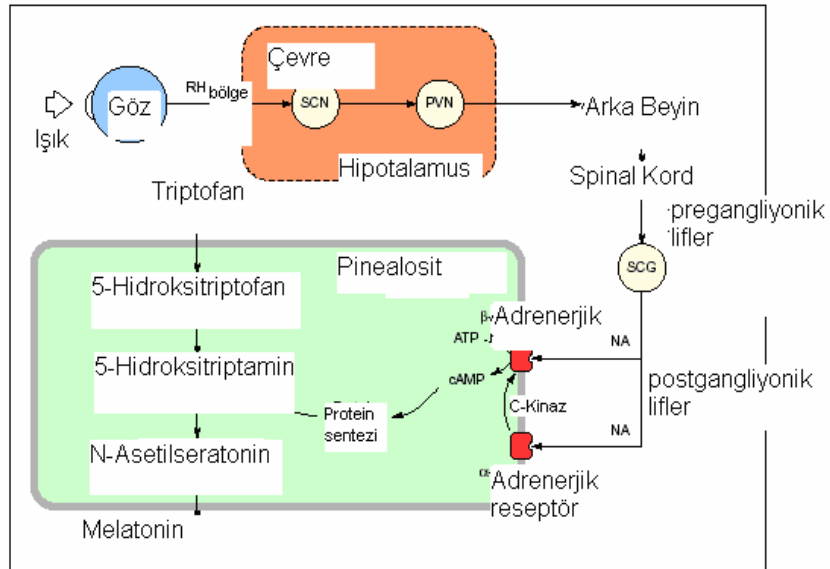


Şekil 3.4. Melatoninin kimyasal yapısı (8).

MT’nin pineal bezden başka, retina (23, 178), lenfositler (44, 46, 66), harder bezi (57) ve intestinal epitelyum’dan da (31, 89) salgılandığı bildirilmektedir. Pineal bezden MT’nin dışında 5-metoksitriptamin ve 5-metoksitriptafol’ü kapsayan indollerin yanı sıra (131) adrenalin, noradrenalin, serotonin (5-Hidroksitriptamin, 5-HT), histamin, inositol, taurin gibi maddeler ve arginin vasotocin, angiotensin I, lipotropinler ve enkefalinler gibi peptidler de salgınmaktadır (120).

3.2.2. Melatoninin biyosentezi ve metabolizması

Pineal bezden salgılanan başlıca hormon olan MT, bir indol türevidir. İndolamin sentezi pinealositlerde meydana gelmektedir (104, 250). MT sentezinde başlangıç maddesi esansiyel bir aminoasit olan triptofandır (29, 109). Sentez için öncelikle triptofan aminoasitinin dolaşımdan hücre içine alınması gerekmektedir (33, 63, 104). Plazmadan aktif transport mekanizması (230) ile hücre içine alınan triptofanın büyük bir kısmı indol metabolizmasında, küçük bir kısmı ise protein sentezinde kullanılır (63). Pinealositlerde, triptofan, 5-hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofana; daha sonra 5-hidroksitriptofan, L-aromatik aminoasid dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) vasıtasıyla 5-HT'ye dönüştürülür (33, 61, 63, 82, 99, 228). 5-HT ise hız sınırlayıcı bir enzim olan N-asetiltransferaz (NAT) aracılığıyla N-asetilserotonine (NAS), son olarak da NAS; hidroksiindol-o-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından MT'ye dönüştürülür (33, 61, 63, 95, 100, 110).



Şekil 3.5. Melatonin sekresyonunun düzenlenmesi (10).

Sentezlenen MT, pineal bezde depolanmadan hızlı bir şekilde komşu kapiller damarlara geçer. Lipofilikliğin çok yüksek olmasından dolayı, bütün biyolojik doku ve sıvılara dağılır (33). Kanda bulunan MT'nin %70'i albumine bağlı olarak taşınır (29, 40, 154, 157, 196, 213). Gerek bağlı, gerek serbest MT kan ile beyin omurilik sıvısı (BOS) arasında çapraz geçiş halindedir (156, 196). İnsanda, birçok vücut sıvısı ve dokuda (kan, BOS, idrar, tükürük, lenf, amniotik sıvı, sperma, retina ve siyatik sinir) MT tespit edilmiştir (33, 63, 251). Ayrıca anneden fötüse plasenta yoluyla, yeni doğanlara ise sütle geçebilmektedir (33, 63, 204, 205, 251). Yarılanma süresi 10-40 dakika olan MT, başlıca karaciğerde ve ikinci derecede de böbreklerde metabolize olur (33, 63, 106). Karaciğerden ilk geçişte MT'nin %90'ı metabolize olur ve mikrozomal enzimler tarafından 6-hidroksimelatonine dönüşür. Bu madde böbrekte sülfat veya daha az olarak da glukuronik aside bağlanarak idrarla atılır (33). MT'nin %1'inden daha azı değişmeden idrarla atılmaktadır (12, 63, 213, 249). İdrardaki başlıca metaboliti, 6-sülfatoksimeletonin'dir (6-HMS= 6-hidroksimeletoninsülfat) (33, 63, 104). Ayrıca, MT oluşumunda öncül madde olan NAS de bir MT metabolitidir (13, 104, 250). MT'nin kendi prekürsürüne dönüşmesi, MT sentezinin bir geri bildirim mekanizmasıyla kontrol edildiğini göstermektedir (33, 63).

Pineal bezde MT dışında başka indolaminlerin ve peptidlerin de mevcut olması, bezin ön hipofiz gibi çok hormonlu bir organ olabileceği teorisinin öne sürülmesine yol açmıştır (251).

3.2.3. Melatonin sekresyonunun düzenlenmesi

MT sentezinin başlıca kaynağı pineal bezdir (33). İnsan dahil tüm canlılarda MT geceleyin daha fazla miktarda salgılanmaktadır (104). Bu nedenle MT'nin pineal bezden sirkadiyan bir ritimde salgılandığı kabul edilir (33, 104, 200). 5-HT'nin, MT'ye dönüştürülmesinde rol oynayan, NAT ve HIOMT enzim aktivitelerinin geceleyin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (104, 226).

Pineal bez içerisinde, postganglionik sempatik sinir uçlarındaki en önemli transmitter, norepinefrin (NE)'dir. Gün boyunca ve ışıқта SCN etkin olarak bu sinir uçlarından NE salınımını durdurur. Karanlıkta ise sinir uçlarından NE salınımı başlar. NE, pinealosit membranındaki β -adrenerjik reseptörlere bağlanır. β -adrenerjik reseptörlerin uyarılması ile hücre içinde önce adenilat siklaz aktive olur ve cAMP artar. Daha sonra NAT ve dolayısıyla MT sentezi hızlanır (13, 16,33, 63, 104, 110, 199). Aydınlik ortamda, cAMP ve NAT düzeylerinde hızlı bir düşüş gözlenir. Pinealosit membranında α -adrenerjik reseptörler de mevcut olup, pineal fonksiyonun düzenlenmesinde β -adrenerjik uyarımı artırıcı bir rol üstlenirler (13, 33, 63, 104, 199).

İnsanda MT salgılanması genellikle 21:00-22:00 saatleri arasında başlar ve 07:00-09:00 saatleri arasında azalarak bazal seviyelere iner. Yetişkinlerde, plazmadaki ortalama maksimum düzeyleri 50-70 pgr/ml'dir (13). MT'nin başlıca metaboliti olan 6-HMS'nin maksimum plazma konsantrasyonu 80-100 pgr/ml arasındadır. Plazma MT konsantrasyonu gece saat 02:00 ile 04:00 arasında en yüksek seviyeye ulaşır (250). MT salgılanmasında mevsimsel farklılıkların da bir etkisi söz konusudur (102, 104, 109). MT düzeyinin yüksek kalma süresi

karanlığın süresine bağlıdır. Kış aylarında uzamış gecelerde bu süre de uzamaktadır (33, 104).

MT hayatın ilk haftasından itibaren pineal bezden düşük, fakat ölçülebilir düzeylerde ve günlük ritim göstermeden salgılanmaktadır (104, 107). İnsanda MT ritminin ne zaman başladığı konusundaki veriler yetersizdir (104). MT'nin kandaki konsantrasyonu yaşa bağlı olarak değişmektedir. Yeni doğanlarda kan MT konsantrasyonu düşük olup, üçüncü aya kadar artmakta ve bu aydan sonra günlük MT ritmi belirginleşmektedir (15, 86, 104). Serum MT düzeyi 1-3 yaş arasında pik seviyesine ulaşmaktadır (250). Bu dönemde, geceleri serum seviyeleri, 325 pgr/ml (1400 pmol/l) gibi yüksek değerlere kadar ulaşmaktadır. Cinsel olgunlaşma sürecinde giderek azalan serum MT düzeyi, 500 pmol/l'nin altına düştüğünde, GnRH salgılanması artar ve puberte başlar. Yetişkin gençlerdeki düzeyi, 40-260 pmol/l'dir (248). Pubertenin gecikmiş olduğu durumlarda MT düzeyinde artış gözlenmiştir. Kan MT düzeyi puberteden sonra sürekli bir azalma göstermektedir (13).

Pineal bezden salgılanan diğer indollerden, 5-metoksitriptamin'in MT'nin ritmiyle uyumlu olarak geceleyin sekresyonunun arttığı, 5-metoksitriptafol'ün ise bunun aksine, günün ışık fazında sekresyonunda artış görüldüğü bildirilmektedir (130).

3.2.4. Melatoninin etki mekanizması

MT bağlayıcı alanların lokalizasyonu ve farmakolojik olarak karakterizasyonu için I-125 ile işaretlenmiş MT çalışmaları sonucunda iki tip MT membran reseptörü tespit edilmiştir (243). Bu iki tip MT bağlayıcı alan, yüksek

affiniteli (20-200 pikomolar konsantrasyonlarda) bağlanma yerleri ve düşük affiniteli (nanomolar konsantrasyonlarda) bağlanma yerleri olarak ayrılmışlardır. Sadece yüksek affiniteli alanlar MT reseptörü olarak karakterize edilmiştir ve genleri klonlanmıştır. Bunların sonucunda üç tip yüksek affiniteli membran reseptörü tanımlanmıştır. MT₁ reseptörü bütün vertebralılarda mevcuttur ve başlıca beyinde ekspresse edilir, MT₂ reseptörü de bütün vertebralılarda mevcuttur ve başlıca retinada ekspresse edilmektedir. MT₃ reseptörünün ise memelilerin dışındaki vertebralılarda bulunduğu rapor edilmiştir (58, 207). Yakın zamanlarda bazı memelilerde, MT₃ için quinon redüktaz enzimi kullanılarak düşük affiniteli alanlar tanımlanmıştır (167).

İnsanlarda, MT₁ reseptör geninin 4q35.1 kromozomunda lokalize olduğu ve SCN ve pars tuberalis’de ekspresse edildiği tespit edilmiştir. MT’nin sirkadian ve reproduktif etkilerinin bu reseptör aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. MT₂ reseptör geni ise 11q21-22 kromozom bölgesinde kodlanmıştır. Beyin ve retinada eksprese olmaktadır ve her iki bölgede de dopaminerjik fonksiyonlar ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. MT₃ reseptör geni ise henüz insanlarda saptanmamıştır (229).

MT reseptörleri plazma membranında yer alır ve hücre fonksiyonlarını genelde ikinci haberciler aracılığıyla gösterirler (237). Hem MT₁ hem de MT₂ reseptörü G-protein kenetli reseptörlerdir (184, 246). MT, cAMP ve cGMP’nin hücre içinde birikmesini inhibe eder (245), hücre içi kalsiyum $[Ca^{+2}]_i$ konsantrasyonunu azaltır ve diaçilgliserol oluşumunu baskılar (244, 245). MT₁ reseptörünün muhtemelen G-protein aracılığıyla fosfotidil inozitol hidrolizi ile adenilat siklaz inhibisyonunda rol aldığı (187), bunların neticesinde cAMP’yi

azaltıcı etki oluşturduğu bildirilmektedir (42). Bu etkinin genellikle pertussis toksin'e (PT) duyarlı G-proteini aracılığıyla olduğu ifade edilmektedir (206). MT₂ reseptörünün de cAMP sentezi ve retinada dopamin sentezinin inhibisyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (59).

MT'nin lipofilik yapıda olmasından dolayı kolayca hücre içine geçerek buradaki yapısal proteinlerle etkileşebileceği bilinmektedir. MT'nin çekirdekteki nükleer retinoid orphan ve Z reseptörlerinin (RZR/ROR) bir ligandı olduğu ifade edilmektedir (22, 45). Yeni bilgiler, MT'nin immünomodülatör etkilerinin nükleer reseptörleriyle ilişkili olabileceğini bildirmektedir (45). MT reseptörleri plazma membran yüzeyinde, sitozolde, çekirdek ve mitokondri membranı gibi hücrenin birçok alanında tespit edilebilmektedir (50, 176, 181).

İnsanların ve insan dışındaki çeşitli türlerin (131, 241) immün sistem hücrelerinde MT reseptörleri; T hücrelerinde (112), Th hücrelerinde (78), nötrofillerde (132) ve monositlerde (19) belirlenmiştir.

3.2.5. Melatoninin fizyolojik ve fizyopatolojik durumlar üzerine etkisi

3.2.5.1. Melatoninin antioksidan etkisi

MT'nin bir antioksidan olduğu ilk kez 1991 yılında Ianas ve arkadaşları (94) tarafından ileri sürülmüştür. Daha sonra, hem *in vitro* (175, 203) hem de *in vivo* (74, 182, 216) çalışmalarla bu görüş desteklenmiştir. Bu çalışmalar ışığında, MT'nin antioksidan etkisini doğrudan, antioksidan enzimlerini aktive ederek ve proenzim aktivasyonunu inhibe etmek suretiyle, üç temel mekanizmayla gösterdiği söylenebilir (256).

MT'nin direkt antioksidan etkisini, hidroksil ($\text{HO}^\cdot$), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), hipoklorik asit (HOCl), nitrik oksit ($\text{NO}^\cdot$) ve peroksinitrit ($\text{ONOO}^\cdot$) gibi oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye ederek, bu radikallerin biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini ortadan kaldırmak suretiyle gösterdiği bildirilmektedir (25, 198). MT'nin oksidasyon ürünü olan N^1 -asetil- N^2 -formil-5-metoksikinüramin (AFMK) (86) ve onun deformile olmuş formu N^1 -asetil-5-metoksikinüramin'in de (AMK) antioksidan özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir (7, 92, 208, 210, 223, 234).

Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik konsantrasyonlardaki MT'nin, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSSG-Rd), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve g-glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonunu ya da aktivitesini artırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir (25, 195).

MT'nin bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir (25, 195). *İn vitro* ve *in vivo* şartlarda, $\text{NO}^\cdot$ ve daha ileri aşamada $\text{OONO}^\cdot$ oluşumuna neden olan nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinin, fizyolojik MT konsantrasyonlarında inhibe edildiği bildirilmektedir (24, 81). MT'nin bu antioksidan etkisini destekleyecek şekilde, oksidatif doku hasarına yol açan kainik asit (76), sisplatin (85), adriyamisin (150), alloksan (186), homosistein (21) ve streptozotosin (151) gibi maddelerle indüklenen oksidatif stresin MT ile önlenemediği gösterilmiştir.

MT hem suda hem de lipid fazda çözünmediğinden, organizmada çok geniş bir alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Kan-beyin bariyerini ve plasentayı

kolayca geçebilmesinden ve hücrenin tüm kısımlarına dağılabilmesinden dolayı, hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkili bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir (12).

3.2.5.2. Melatonin-yaşlanma ilişkisi

Yaşlanan pinealositlerde hücre yapısında belirgin gerileyici değişiklikler görülür. İlerleyen yaşla birlikte tip 1 pinealositlerde lizozomlarda artış ve tip 2 pinealositlerde ise hücre yapısında değişiklikler görülür. Yaşlandıkça çekirdek / sitoplazma oranı küçülmektedir. Bu da pineal bezin işlevinin gençlerde daha fazla olduğunun yapısal bir göstergesidir. Ayrıca pinealosit sayısında da yaşlanmayla birlikte bir azalma görülür (35, 36).

Yaşlanmayla birlikte, pineal bezde MT sentezi azalmaktadır (177). Bu amaçla pubertedeki ve yaşlanmış gruplarda yapılan histolojik çalışmalarda ve pineal enzimlerin biyokimyasal analizlerinde, bezin MT sentez yeteneğinde bir negatiflik gözlemlenmiştir (236). Serbest radikal hasarının, zaman içinde üst üste eklenerek, yaşlanmanın bazı dejeneratif etkilerine katkıda bulunabileceği fikri, ilk kez 1956'da Harman tarafından ortaya atılmıştır (87). Daha sonraki çalışmalarda, vücutta oluşan serbest radikallerin, yaşlanma sürecinde ve yaşlanma ile ilgili birçok patolojide rolü olduğuna dair önemli bulgular elde edilmiştir (87, 197). MT, yaşa bağlı olarak azaldığından, serbest radikallere bağlı beyin hasarı da artmaktadır. Bu sebeple de, MT'nin yaşlanmayı geciktirmede kullanımının mümkün olduğu varsayımı üzerinde durulmaktadır (107).

3.2.5.3. Melatoninin beslenme davranışı üzerine etkisi

Sıçanlar ve insanların, sirkadiyan ritme uygun olarak, gıda alımında benzer özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir. Sıçanlar yemeklerinin %70'inden fazlasını karanlık faz esnasında tüketirler. Bu günlük ritmin mekanizması açık değildir, fakat SCN'ye retinal hipotalamik projeksiyonun etkisi sonucu sirkadiyan ritim oluşumuyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (144, 152, 153).

MT'nin gıda alımı üzerine etkisiyle ilgili olarak, farklı türlerde çelişkili sonuçlar içeren çalışmalar mevcuttur. Sıçanlarda doz bağımlı olarak MT uygulamasının orta ve düşük dozlarda gıda alımını artırdığı, yüksek dozlarda ise azalttığını rapor eden çalışmalar mevcuttur (96). MT'nin gıda alımı üzerine doğrudan etkili olmadığı, fakat dolaylı olarak hipotalamo-hipofizeal-adrenal eksen aktivasyonu aracılığıyla, 5-HT reseptörlerinden 5-HT_{2A}'nın baskılanması sebebiyle, hiperfajik bir etkiye sahip olabileceği rapor edilmiştir (194). MT'nin hamsterlerde (20) ve goldfishlerde gıda alımını baskıladığı tespit edilmiştir (188). Sıçan ve hamsterlerdeki bu etkilere karşılık, tundra faresi (162) ve farelerde ise (30) gıda alımını uyardığı rapor edilmiştir.

MT'nin iştahın düzenlenmesi ile ilgili ghrelin (161, 162) ve leptin (142, 160) hormonları üzerine de etkisinin olduğu belirlenmiştir.

3.2.5.4. Melatoninin kardiyovasküler sistem üzerine etkisi

Yaşlanma ile kalp hastalıkları insidansının artması ve MT düzeyinin azalması (202), ani kardiyak ölüm insidansının sabah saatlerinde yükselmesi (159) ve bu saatlerde MT seviyesinin anlamlı bir şekilde düşük olması (158), kronik kalp hastalığı olanlarda normal bireylere göre MT seviyesinin düşük bulunması

(141), MT'nin trombosit kümeleşmesi (55, 159) ve lipid peroksidasyonunu azaltması, ilginç bir şekilde kolesterol düzeyi normal kişilerde herhangi bir etki göstermezken, yüksek kolesterolü olan kişilerin serum kolesterol düzeylerini düşürmesi (173) ve spontan hipertansif sıçanlarda, kan basıncını düşürüp bazal sempatik tonusu inhibe etmesi (75, 141) gibi bulgular, MT'nin çeşitli kalp hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir (173).

3.2.5.5. Melatoninin anti-kanserojenik etkisi

Hayvanlardaki deneysel çalışmalarda, türe bağlı olarak, pinealektominin (Pnx), tümör oluşumunu arttırdığı ve MT uygulamasının kanserojenlerin neden olduğu tümör gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (233). İmmünoterapi ve kemoterapi alan hastalarda, tedaviye MT eklenmesiyle, tümör gelişiminde gerilemenin yanı sıra (126) yan etki şiddetinde azalma (126, 136) ve yaşam süresinde uzama bildirilmiştir (126).

Kanserin, azalmış MT salınımı ve azalmış immün reaktivite ile birlikte seyretmesi, kanser immünoterapisinde MT'nin terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir (111). Bilindiği gibi, natural killer (NK) ve Lymphokine-activated killer (LAK) hücreleri normal hücreye dokunmaksızın malign veya virus ile enfekte hücreleri yok etmektedir (111, 172). İnterlökin (IL)-2'nin, NK aktivitesini ve NK ile T hücrelerinden LAK hücrelerinin oluşumunu artırdığı tespit edilmiştir (54). Ancak, IL-2'nin anti-kanser etkisinin çok yüksek dozlarda ortaya çıkması ve ciddi toksik etkilerinin olması kullanımını kısıtlamaktadır (111). Akciğer metastazlarının oluşumu ve gelişiminin önlenmesinde IL-2 ve MT kombinasyonları denenmiş, MT'nin IL-2'nin anti-kanser etkisini additif bir

şekilde artırdığı belirlenmiştir. Bu durum, IL-2'nin dozunun azaltılmasına ve toksik yan etkilerinin kaybolmasına imkan sağlamıştır. Benzer klinik çalışmalar, metastatik renal karsinom, metastatik küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu, metastatik gastrik karsinom ve meme karsinomunda yürütülmüş ve başarılı sonuçlar alınmıştır (125, 129).

3.2.5.6. Melatoninin iskemi-reperfüzyon hasarına etkisi

İzole sıçan kalbinde yapılan bir çalışmada, MT'nin iskemi-reperfüzyon aritmilerinde koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (113). Yine, Pnx uygulanan sıçanlarda yapılan bir *in vivo* deney modelinde, reperfüzyondaki irreversibl ventrikül fibrilasyonuna bağlı ölüm sıklığının arttığı ve bu durumun MT uygulamasıyla düzeldiği tespit edilmiştir (173).

İskemi-reperfüzyon ile indüklenen gastrik mukoza hasarında, lipid peroksidasyonuna ve oksijen metabolitlerine bağlı oluşan gastrik iskemi-reperfüzyon hasarını MT'nin önlediği rapor edilmiştir (235). MT'nin, karaciğerde de iskemi-reperfüzyonun neden olduğu hasarı önlediği ve yine fötal sıçan beyinde oksidatif lipid ve DNA hasarına karşı etkisi tespit edilmiştir (173).

3.2.5.7. Melatoninin uyku üzerine etkisi

Pineal bezden MT salgılanma ritmi, normal uyku alışkanlığı saatleri ile senkronizedir. Kan MT düzeyi geceleri gündüze göre yaklaşık 10 kat daha fazladır. Uyku bozukluğu olan yaşlılarda serum MT düzeyi, uyku problemi olmayan aynı yaştakilere oranla daha düşük bulunmuştur. Yetişkinlere oral 5

mg/gün verildiğinde, REM uyku süresini ve uyku kalitesini artırdığı rapor edilmiştir (254).

MT'nin gece boyunca düşük düzeyde salgılanması uykunun azalmasına ve bu sebeple uykuya duyulan ihtiyacın artmasına neden olur. Akşamın erken saatlerinde yeterli miktarda MT salgılanmaz ise uyuma güçleşir. Sekresyon devam etmediği takdirde gece uyanmaları görülür. Pineal bezin fazla miktarda ve uzun süre MT salgıladığı durumlarda ise uyku isteği devam eder (13). Deneysel olarak sıçan ve farelerde intraperitoneal MT uygulaması sonucu, uyuma süresinin uzadığı bildirilmiştir (63).

Jet lag, denizaşırı uçak seyahatleri sonrasında, vücut ritminin bozulmasına bağlı olarak gelişen, uykusuzluk ve grip benzeri semptomlarla kendini gösteren bir rahatsızlıktır (173). MT kullanılmak suretiyle jet lag %50 oranında azaltılabilmektedir. Seyahatin sonlandığı ülkede yatma zamanından bir saat önce MT alınması uyku-uyanıklık periyodunun yeni ortama adaptasyonunu sağlamaktadır (105).

3.2.5.8. Melatoninin endokrin ve üreme sistemi üzerine etkisi

Pineal bezin endokrin fonksiyonları, üreme sistemi üzerine olan etkileri ve nongonadal endokrin organlar (tiroid, adrenal bez vs) üzerine olan etkileri olarak iki ayrı başlıkta incelenebilir (63, 111). Erişkin dişi hayvanlara kronik MT verildiğinde, over boyutlarında ve ağırlığında azalma olmakta, ayrıca östrus sıklığı da azalmaktadır (254). Erişkin erkek hayvanlarda ise seminifer vezikül küçülmektedir. Pnx, juvenil sıçanlarda prematüre seksüel matürasyona, erişkinlerde ise gonadlarda ve aksesuar organlarda büyümeye yol açmaktadır. Bu

etki MT verilmesiyle bloke edilebilmektedir (99, 199, 254). MT'nin, hipotalamus-hipofiz-gonadlar sistemi üzerine inhibitör bir etkiye sahip olduğu kabul edilmektedir (26, 33, 104, 199). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, leydig hücrelerinde MT'nin bağlandığı reseptörler gösterilmiş ve MT'nin testis üzerine doğrudan etki ederek, leydig hücrelerinde testosteron sentezini inhibe ettiği tespit edilmiştir (163, 257). Ayrıca, sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, MT'nin doza bağlı olarak gebe ve gebe olmayan sıçanların miyometriumunda, spontan ve oksitosinle indüklenen kontraksiyonları inhibe ettiği bildirilmiştir (17).

Pineal bezin ön hipofiz hormonları olan prolaktin, lüteinleştirici hormon (LH), folikül uyarıcı hormon (FSH) sekresyonu üzerine de etkisi vardır (108). Yüksek doz MT gonadotropin seviyelerini düşürürken, prolaktin ve growth hormon (GH) seviyelerini artırmaktadır (12, 99). MT etkisini hipotalamus düzeyinde göstermektedir (73, 111). Ancak, doğrudan hipofiz bezi üzerinde de etkili olabileceği ifade edilmektedir (111, 199).

MT ayrıca tiroid, böbreküstü bezi ve diğer endokrin organlar üzerinde de etkilidir. Tiroid bezi fonksiyonları üzerinde genel bir inhibitör etki gösterir (105). Böbreküstü bezi fonksiyonları üzerinde de inhibitör etki göstererek, glukokortikoid ve mineralokortikoid sekresyonunu azaltır (26, 63, 104, 105). Yine MT'nin vazopressinin günlük salgılanma ritmi üzerine uyarıcı etkisinin olduğu da bildirilmektedir (67, 68, 104, 105).

3.2.5.9. Melatoninin merkezi sinir sistemi üzerine etkisi

MT, beyin elektriksel aktivitesi üzerinde düzenleyici etkilere sahiptir (105, 111). MT verildiğinde elektroensefalogramda (EEG) başlıca alfa dalgalarında artış

olmakta, anti-MT antikorlarının varlığında veya Pnx yapılan hayvanlarda epileptik nöbetler ortaya çıkmaktadır (77, 111).

Son derece lipofilik olan MT'nin sinir hücrelerine geçişi çok kolaydır. Sinir sonlanmalarından salınan eksitatör nörotransmitterler, serbest radikallerin oluşumunu artırır ve beynin değişik bölgelerindeki dejenerasyonları hızlandırırlar. Merkezi sinir sisteminde (MSS) oluşan bu dejenerasyon, yaş ilerledikçe artar Bu artış, MT seviyesindeki azalmayla da ilişkilidir (253). MT'nin MSS'de, özellikle serbest radikallerle ilişkili olduğu ileri sürülen alzheimer, parkinson gibi hastalık durumlarında yararlı etkilerinin olabileceği düşünülmektedir (77, 173).

Depresyonlu hastalarda, plazma MT seviyeleri düşük bulunmuştur (105). Bu durum, muhtemelen adrenerjik tonustaki azalmaya bağlıdır (173). Yine şizofrenide MT'nin amplitüdünde düşme tespit edilmiştir. Depresyonda, MT amplitüdündeki azalmaya kortizoldeki artış eşlik etmektedir. Mania'da ise MT amplitüdünde daha ziyade artış gözlenmektedir. Bipolar (manik depresif) hastalarda, MT'nin ışığa karşı cevabı daha belirgindir. Bu gözlem, diagnostik öneme sahip olabilir (105).

Sürekli analjezik kullanan hastalarda, geceleri analjezik ihtiyacının azaldığı bildirilmiştir. Bu azalma, geceleri serum MT düzeylerindeki artışla koreledir. Analjezik etkisindeki bu gün içi varyasyonlar, Pnx yapılan sıçanlarda ortadan kalkmaktadır. MT'nin bu etkisinin opioid reseptörleri aracılığıyla olduğu düşünülmektedir (60).

3.2.5.10. Melatoninin immün sistem üzerine etkisi

Pnx uygulanmış sıçanlarda, timus bezinin yapısal olarak değişiklik gösterdiği (170) ve yaşlı farelerde (191), MT tedavisi veya pineal greft uygulamasının (191) timus bezinde involusyonu  nlediğinin gözlemlenmesi, MT'nin immün sistemi etkilediği görüşüne rehberlik etmiştir (124, 140, 191, 195, 224).

Pineal bez, salgıladığı MT vasıtasıyla (135, 164) hücresel ve humoral immünitenin düzenlenmesinde rol alan ve bu sebeple immün sistem üzerine çevresel etkileri ayarlamayı sağlayan önemli organlardan biridir (81, 137, 138). MT uygulamasının, normal ve immün sistemi baskılanmış ev farelerinin her ikisinde de *in vitro* ve *in vivo* antikor yanıtlarını yükselttiği (43, 137, 144) ve immün sistemi tehlikeye girmiş fare grubunda T yardımcı (Th) hücre aktivitesini düzelttiği tespit edilmiştir (43).

MT'nin immün sistem üzerine olan etkisiyle ilgili mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Son zamanlarda MT'nin kendisi için lenfoid hücrelerde mevcut olan spesifik reseptörlere bağlanarak, lenfoid hücreler üzerinde direkt bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (39). Bununla birlikte, MT'nin B lenfositlerine değil ama T lenfositlerine bağlandığı gösterilmiştir (78, 138). Üstelik, lenfosit alt popülasyonları üzerinde yapılan çalışmalarda, CD8⁺ hücrelerinden ziyade CD4⁺ hücreleri üzerinde, MT bağlayıcı alanlar tespit edilmiştir. Bu da lenfositler arasında CD4⁺ hücrelerinin MT için hedef olabileceğini akla getirmektedir (78). Böylece MT'nin immün sistemi modüle edici etkisinin, hücre içi sinyallerin aktivasyonuyla, hedef hücreler üzerindeki spesifik hormon resept rllerine bağlanması aracılığıyla ayarlandığı sanılmaktadır (83).

MT, immün yetmezlik durumlarında uygulandığında, belirgin bir immün aktivasyona yol açmaktadır. Imm n parametreler üzerine olumsuz etkileri olduğu bilinen akut stres ve immün sistemi baskılayan farmakolojik uygulamalar ile oluşan immün yetmezlik tabloları MT ile kontrol altına alınabilmektedir (137, 139). MT'nin en önemli hedef organlarından biri timus'dur. MT'nin immün yanıtı artırıcı etkisi, Th lenfositlerden kaynaklanan opioid peptidler, lenfokinler ve hipofizer hormonlar aracılığıyla olmaktadır. Diğer taraftan, IL-2, İnterferon-gamma (IFN- ) ve timus bezi hormonlarının MT'nin sentez ve salınımını etkiledikleri bilinmektedir (137).

Garcia-Maurino ve arkadaşları (71), *in vitro* şartlarda MT'nin IL-2 ve IFN-  üretimini artırdığını bulmuş ve MT'nin Th1 lenfositlerini aktive edebileceğini bildirmiştir. Th1 immün yanıtın yönlendirilmesinden IL-12'nin sorumlu olduğu bilinmektedir (218). AIDS'de hastalığın ilerleyişinin, IL-4 ve IL-10  retimindeki bir artmayla beraber, IL-2, IL-12 ve IFN-  üretiminde mononükleer hücrelerin yetersizliğiyle paralel olmasından dolayı HIV-1'e karşı Th1 yanıtın önemi a ktır. Bu doğrultuda yapılan bir çalışmada, IL-12 ile MT arasındaki etkileşim ortaya konulmaya çalışılmıştır. Çalışmada, HIV-1 infekte bireyler ile sağlıklı kontrol grubundakilerin MT seviyesi ölçülmüş ve HIV-1 infekte grubunda MT seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde daha düşük bulunmuştur. Ölçülen IL-12 seviyeleri de MT ile paralel çıkmıştır. Ancak, IL-2 için infekte ve infekte olmayan gruplardan çıkan sonuç anlamlı bulunmamıştır. MT ile IL-12'nin karşılıklı etkileşimini tam olarak belirlemek amacıyla, gece MT seviyesi ölçülmüş ve günlük ritim dolayısıyla MT seviyesi yüksek bulunmuş, MT'nin yüksek

seviyelerde olduğu bu dönemde, IL-12 seviyesinde de artış olduğu gözlenmiştir. Bu bilgiler iki immünomodülatör arasındaki etkileşimi doğrulamaktadır (169).

İmmün sistemin homeostazisinde T yardımcı 1/T yardımcı 2 (Th1/Th2) dengesi can alıcı derecede önem arz etmektedir. Th1/Th2 dengesindeki kalıcı bozulmaların otoimmün hastalıklara yol açtığı bilinmektedir. MT'nin yalnızca Th1 hücreleri üzerine ya da aynı zamanda Th2 hücreleri üzerine de etkili olup olmadığı henüz net değildir (140). 1997 yılında yapılan bir çalışmada, *in vitro* şartlarda, MT'nin fizyolojik konsantrasyonlarının IL-2, IL-6 ve IFN- γ seviyesini artırdığı bulunmuştur (71). Oysa 1988 yılında Arzt ve arkadaşları (14), MT ile inkübasyonu takiben IFN- γ seviyesinin azaldığını bildirmişlerdir. Yine 2001 yılında yapılan başka bir *in vitro* çalışmada ise MT'nin IFN- γ üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı bulunmuştur. Bu çalışmada, MT uygulamasıyla baskılayıcı bir sitokin olan IL-10 seviyesinde meydana gelen azalma nedeniyle IFN- γ seviyesinin artabileceği ifade edilmiştir (116). Antartika'da yapılan bir kış çalışmasında ise IFN- γ seviyesi yüksek, IL-10 seviyesi de düşük bulunmuştur (222).

Gerek *in vivo* gerekse *in vitro* şartlarda yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiş olması MT'nin immün sistem hücreleri ve mediyatörleri olan sitokinler üzerine olan etki mekanizmasının henüz tam olarak anlaşılamadığını ve bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir (140).

3.3. İmmün sistem

Organizma, enfeksiyon etkenine birbirini takip eden iki önemli savunma hattında karşı koyarak hastalıktan korunmaya veya hastalık oluşmuşsa etkenin

üstesinden gelmeye çalışır. Birinci hat savunmasını doğal direnç mekanizmaları oluşturur. Bu mekanizmalar, mikroorganizmalar için seçicilik göstermeksizin (non-spesifik), konağın patojen mikroorganizmaya maruz kalmasını izleyen ilk saatler içinde enfeksiyonu sınırlamaya yönelik olarak fonksiyon gösterirler. Doğal immüitenin başlıca hücreleri makrofajlar ve NK hücreleridir. Bu reaksiyona granüositler de (özellikle nötrofiller) katılırlar. İkinci hat savunması, kazanılmış (spesifik, adaptif) immünite için çalışan mekanizmaların harekete geçmesi ile başlar. Bu savunma, organizmanın antijene primer ve sekonder cevabına göre, belli bir süre sonunda, humoral ve/veya hücrese düzeyde ve etkene spesifik bir immüitenin kazanılması ile elde edilir (106).

İmmün cevap, kendi kalıtsal yapısına yabancı antijen moleküllerini tanıma yeteneğinde bağışıklık sistemi olan canlının, patojenlere karşı oluşturduğu reaksiyonlardır. Konak organizmaya giren yabancı patojenler, antijen sunucu hücreler (antigen presenting cells, APC) tarafından karşılanmakta ve lenfositlere sunulmaktadır. Timusa bağımlı antijenler ile karşılaşan APC, antijenleri Th lenfositlere sunarken, IL-1 salarak lenfositlerin çoğalmalarına ve lenfokin salgılamalarına yol açmaktadır. Bir endojen pirojen olan IL-1, ateş yükselmesine ve granülositoz oluşmasına neden olmaktadır. Timusa bağımsız antijenler doğrudan B lenfositlere sunulmaktadır. APC tarafından uyarılan Th lenfositlerin saldıkları lenfokinler, T ve B lenfositleri farklılaştırmakta ve immün cevap ürünlerinin oluşmasını sağlamaktadır (174).

3.3.1. Sitokinler

Sitokinler, doğal ve spesifik immün yanıt oluşumunda, immün sistem hücrelerinin karşılıklı ilişkilerini düzenleyen protein veya glikoprotein yapısında maddelerdir (2, 28). Hücreler arası sinyal molekülü olan sitokinler, inflamasyon, hücre büyümesi, hematopoez ve yara iyileşmesi gibi farklı birçok olayın düzenlenmesinde yer alırlar (2, 166).

Aktif T lenfositleri tarafından sentezlenip salınanlar lenfokin, aktif monosit/makrofajlardan sentezlenip salınanlar monokin ve lökositler arasında etkileşim yapanlar ise interlökin olarak adlandırılmıştır. Fakat, günümüzde bu maddelerin, bu gruptaki hücrelerden başka hücrelerden de sentezlenip salındığının keşfedilmesiyle genel bir tanım olarak sitokin deyiimi kabul görmeye başlamıştır (174).

Sitokin olarak adlandırılan, bu heterojen protein grubunun ortak karakteristik özellikleri şunlardır (1, 18, 157, 166, 171):

- Düşük molekül ağırlığına sahiptirler (80 kDA'dan küçük).
- Son derece potenttirler, genellikle pikomolar konsantrasyonlarda fonksiyon gösterirler.
- İmmün cevabı, şiddetlendirmek veya baskılamak suretiyle düzenlerler.
- Lenfoid hücrelerin ve diğer bazı hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlarlar.
- Her sitokin ya da sitokin grubu, kendisi için spesifik, yüksek affiniteli hücre yüzey reseptörleri ile reaksiyona girer. Sitokinlerin hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanması, hücrenin RNA yapısını ve protein sentezini etkileyerek, hücrenin fonksiyonunda değişime yol açar.

- Kemik iliğine etki ederek hematopoietik regülasyona da katılırlar.
- Bazı hipofiz hormonlarının ve diğer biyolojik maddelerin sentez ve salınmalarına neden olabilirler.
- Ateş ve akut faz cevabını oluştururlar.
- Antiviral etkinlik gösterirler (özellikle interferonlar).
- Etkileri genelde otokrin veya parakrin şekildedir ve etki süreleri oldukça kısadır (saniyeler-dakikalar ile sınırlıdır). Bununla birlikte, bir kısım sitokinler endokrin yolla vücudun uzak bölgelerine periferik dolaşım ile ulaşarak, bu bölgelerde de etkili olurlar. Böylece, serumda bazı durumlarda saptanabilir konsantrasyona ulaşabilirler. Örneğin: Meningokokal menenjit (247), lepramatöz lepra, leyişmaniyöz (189), gonore (90) ve kandidiyoz (211) gibi enfeksiyöz durumlarda, polimiyalji romatika (240) gibi otoimmün hastalıklarda, çeşitli çoğul organ yetmezliği durumlarında (84), akut pankreatitte (91), endometrioste (179), prostat kanserinde (6) ve miyokard infarktüsünde (145) hastalık seyri ile yüksek serum sitokin seviyeleri arasında ilişki olduğu bildirilmektedir (28).

Antijen bağlanmasını takiben, aktive olan T lenfositler, başta IL-2, IL-4 ve IFN- γ olmak üzere ilk sitokin grubunu sentezlerler. Monositler, T lenfositlerden sentezlenen sitokinlere cevap olarak, ikinci grup sitokinleri oluştururlar. Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) ve IL-1'in de içinde yer aldığı bu monosit ürünleri, immün fonksiyonu olan hücreler üzerinde düzenleyici etkilere sahiptirler. Takip eden immünolojik olayları artıran ya da baskılayan sinyaller oluştururlar. Aktif monositlerin diğer ürünleri (prostaglandinler ve lökotrienler) immün sistem hücrelerinin aktivasyonunu etkilerler. Tüm bu kompleks ilişkiler bütününe *sitokin ağı* adı verilmektedir (114, 215).

Sitokinler, fonksiyonel olarak řu şekilde sınıflandırılabilir (103):

- Yangıyı teşvik edici (Proinflamatuvar) sitokinler: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α
- Yangıyı durdurucu (anti-inflamatuvar) sitokinler: IL-10, IL-13, TGF- β
- İmmün regülatör sitokinler: IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IFN- γ ve TGF- β
- Anti-infeksiyöz sitokinler: IFN- α ve β , IFN- γ (viruslar), TNF- α (bakteriler)
- Hematopoezi teşvik eden sitokinler: G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-5 ve IL-7
- Anti-proliferatif sitokinler: IFN- γ , TNF- α , TGF- β

3.3.1.1. Interferon-gamma (IFN- γ)

21-24 kD molekül ağırlığına sahip olan, immün ya da tip II interferon olarak da bilinen homodimer yapıda bir glikoproteindir. IFN- γ , başlıca Th1 hücreleri, CD8⁺ T hücreleri, NK hücreleri, B lenfositleri, dendritik hücreler ve aktif makrofajlardan salgınır (1, 106, 171). Antiviral etkiyi artıran IFN- γ , ayrıca mononükleer fagositlerin güçlü bir aktivatörüdür. IFN- γ , temel Makrofaj Aktive Edici Faktör'dür (MAF), bunun yanı sıra, Major Histokompatibilite Kompleksi-I (MHC-I) molekül ekspresyonunu artırır, nötrofilleri aktive eder, NK hücrelerin sitolitik aktivitelerini uyarır ve TNF'nin endotel hücrelerine olan etkilerini güçlendirir (1, 171). IFN- γ , hücre aracılı immün yanıtın yönlendirilmesinde önemli rolü olan bir sitokindir (64).

3.3.1.2. Interlökin-4 (IL-4)

20 kD ağırlığında bir glikoproteindir. Temel fizyolojik etkisi alerjik olayları düzenlemektir. Antijenle uyarılmış $CD4^+$ T lenfositlerinden, özellikle Th2 alt grubundan salgılanırlar. B ve T lenfositlerinin büyüme, etkinlik ve farklılaşmasından sorumludurlar. Aktive mast hücreleri, bazofil hücreler ve bazı $CD8^+$ hücreleri de IL-4 üretirler (1, 171, 227).

IL-4, B hücre büyüme faktörü 1 (BCGF-1) veya B hücre uyarıcı faktör 1 (BCSF-1) olarak da bilinir. IL-4 kodlayan genler 5. kromozom üzerindedir. Bu bölge IL-3, IL-5, granülosit/monosit- koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve monosit-koloni uyarıcı faktör (M-CSF) reseptör genlerini de bulundurduğundan hemopoezde önemlidir (97). IL-4, B lenfositler ve monositler üzerinde IgE'nin düşük affiniteli reseptörünün (CD23) belirmesini artırır (232). IgE üretimi için gerekli olan ve B hücrelerinin bu ağır zincir izotipine değişimini uyaran temel sitokindir. IgE, ani hipersensitive (alerjik) reaksiyonların aracısıdır ve IL-4 üretiminin artışında allerjenlerin gelişiminin de merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (1, 171, 227). Bu sitokinin antikoagulan etki de gösterebildiği ayrıca helmint enfeksiyonlarında da rol aldığı bildirilmektedir (238).

IL-4, makrofaj aktivasyonunu inhibe eder ve IL-1 gibi sitokinlerle, nitrik oksit (NO) ve prostaglandinlerin üretimindeki artış da dahil, $IFN-\gamma$ 'nın makrofaj aktive edici etkisini bloke eder. Özellikle Th2 alt grubu dahil olmak üzere T hücrelerinin, büyüme ve farklılaşmasında rol oynar. Endotel hücreleri üzerine etki ederek, lenfosit, monosit ve özellikle eozinofillerin bağlanması artışı neden olan Damar Hücresi Adezyon Molekülü-1'in (VCAM-1) ekspresyonunu uyarır. IL-4'e maruz kalan endotel hücreleri bir kemokin olan Monosit Kemotaktik

Protein-1'i (MCP-1) ve özellikle eozinofillere etki eden henüz tanımlanmamış bir kemokini (Eotaksin) salgırlar. Yani, yüksek lokal konsantrasyonlarda, IL-4 monosit ve eozinofilden zengin inflamatuvar reaksiyonları başlatır (1, 171, 227).

3.3.1.3. İnterlökin-10 (IL-10)

18 kD molekül ağırlığında bir sitokin olup, CD4⁺ yardımcı hücrelerinin Th2 alt grubu tarafından üretilir. Ayrıca, bazı aktive B hücreleri, insanlarda Th1 hücreleri (101, 258), timositler, Epstein-Barr virusu ile infekte hücreler (174), aktive makrofajlar ve bazı non-lenfositik hücre tipleri (keratinositler) tarafından da üretilir. IL-10'un iki önemli fonksiyonu vardır. Birincisi; makrofajlar tarafından sitokinlerin (TNF, IL-1, IL-12, kemokin) üretimini engellemek, ikincisi ise makrofajların T hücre aktivasyonundaki işlevlerini engellemektir. Bu ikinci etkiyi, MHC-II moleküllerinin ve bazı yardımcı uyarıcıların ekspresyonunu azaltarak yapar. Bu etkilerin sonucunda, T hücresi aracılığıyla gelişen hücresel immün yanıt inhibe edilir (1, 166). IL-10'un, IL-2 ve IFN- γ sentezinin inhibisyonu, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF sentezinin inhibisyonu, NK ve makrofaj aktivasyonunun inhibisyonu, reaktif NO yapımının baskılanması, B hücre çoğalması ve farklılaşmasının indüklenmesi gibi etkileri de vardır (106).

IL-10, temel olarak yangısal reaksiyonları baskılar. Birçok infeksiyon sırasında IFN- γ cevabına IL-10 yapımı da eşlik eder. Bunun Tip 1 sitokin cevabı ile oluşabilecek doku hasarının en aza indirilmesi amacıyla gerçekleştiği sanılmaktadır (106).

3.3.2. T lenfositleri

Timusun kontrolünde olgunlaşarak ikincil lenfoid organlarda yerini alan T lenfositleri, hücresel immün yanıttan sorumlu olan hücrelerdir (174). Kemik iliğinden çıkarak, kortiko-medullar kavşaktan timusa giren öncü T hücreleri (27), timus korteksinde hızla çoğalır ve çeşitli nöroendokrin uyarıların etkisiyle olgun T hücresinin fonksiyonel özelliklerini kazanırlar (74). Olgunlaşmamış T hücreleri timustaki gelişimleri süresince T hücre reseptörü (TCR) genlerinin yeniden düzenlenmesi ve hücre yüzey moleküllerinin ekspresyonundaki değişimleri de kapsayan süreçte pozitif ve negatif seleksiyona tabi tutularak olgunlaşırlar (62, 148, 168). Kanda dolaşan küçük lenfositlerin %78-80'i T lenfositleridir. Kanda $1-2.5 \times 10^9$ /litre kadar T lenfositleri bulunmaktadır. Bunlardan CD4 reseptörüne sahip olanların sayısı $0.5-1.6 \times 10^9$ /litre, CD8 reseptörüne sahip olanların sayısı ise $0.3-0.9 \times 10^9$ /litre'dir. T lenfositlerini B lenfositlerinden ayıran temel özellik, T lenfositlerinin mevcut CD2 reseptörleri aracılığıyla koyun eritrositlerine bağlanmasıdır. Bu özellikten yararlanılarak, *rozet testi* ile T lenfositler tanımlanır (174).

T lenfositleri, olgunlaşma sürecinin sonrasında, naif (uyarılmamış) $CD4^+$ veya $CD8^+$ timus hücresi olarak periferel T hücre havuzuna göç edip Th $CD4^+$ ya da sitotoksik T (Tc) ve supressör T (Ts) $CD8^+$ hücresi olarak döngüyü tamamlamış olurlar (103, 106, 174). Fare ve insan T hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, Th hücrelerinin farklı tipleri olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır. $CD4^+$ hücreleri, sitokin üretim profillerine göre Th0, Th1, Th2 ve Th3 hücreleri olarak sınıflandırılmaktadır (157, 212, 218). Th1 hücreleri, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ ve TNF- β gibi sitokinler salgılayarak, hücresel bağışıklığın

düzenlenmesinde; Th2 hücreleri de, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 salgılayarak, humoral bağışıklığın düzenlenmesinde rol alırlar (118, 219). Hücre aracılı immünitede rol oynayan Th1 hücrelerine ait sitokinler, gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarında işe karışırken; humoral immün cevapta rol alan Th2 hücrelerine ait sitokinler ise, hızlı tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarında rol oynamaktadır (3, 157, 218).

Günümüzde, bireysel toleransı (self-tolerance) koruma ve etkili bir immün cevap oluşumu için kritik önemi olan Th1 ve Th2 kaynaklı sitokinler aracılığıyla, immün dengenin (Th1/Th2) korunduğu kabul edilmektedir (165). Otoimmün hastalıkların patogeneğinde Th1 ve Th2 dengesinin önemi vurgulanmaktadır. Bu hastalıklarla ilgili olarak Th1 ya da Th2 baskınlığının çok kritik bir öneme sahip olduğuna dair deliller her geçen gün artmaktadır (93). Örneğin, alerji ve astım gibi çeşitli hastalıklarda, Th2 sitokinlerinin seviyesinin Th1 hücrelerinden salgılanan sitokinlerden daha yüksek olduğu (98); pre-eklampsia hastalarında ise IL-2 ve IFN- γ seviyelerinde artış tespit edilmişken, Th2 sitokini olan IL-4 düzeyinin ise azaldığı belirlenmiştir (217). Sağlıklı gebelikte PBMC kültürlerinde, IL-4 üretiminden sorumlu m-RNA ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğu bildirilmiştir (239). Bir Th2 sitokini olan IL-10'un abortus eğiliminde olan farelere enjeksiyonu ile fetal kaybın önlenemediği gösterilmiştir (48). IL-10'un normal gebeliğin sürdürülmesinde gerekli bir Th2 sitokini olduğu düşünülmektedir (49). Konuyla ilgili olarak, Boztosun ve arkadaşları (28) tarafından yapılan bir çalışmada, serum IL-10 konsantrasyonları tüm gebeliklerde gebe olmayanlardan daha yüksek değerlerde saptanmış ve başarılı gebeliklerin artmış IL-10 konsantrasyonları ile ilişkili olduğu, rekürren spontan abortus'lu

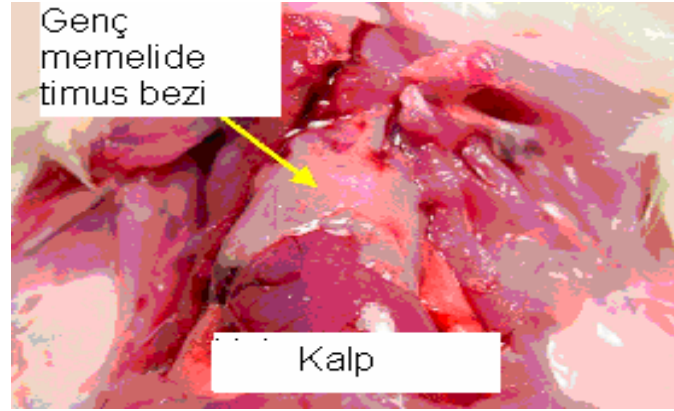
(RSA) kadınlarda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte serum Th1 cevabı artışı eğiliminin gözlenmesi, RSA ile Th1 baskınlığı arasında ilişki olabileceği, sağlıklı gebeliklerin ise periferik kanda artmış Th2 cevabı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir.

3.3.3. Timus bezi

Timus, lenfoid organlar arasında endoderm, mezoderm ve ektoderm olmak üzere her üç tabakadan da hücre içermesi bakımından benzeri olmayan bir organdır. Fetal yaşamın 6. haftasında şekillenir (174) ve yeni doğanda 12-15 gram kadar olup, pubertede 30-40 grama kadar büyür. İleri yaşlarda ise yağ dokusuna değişim göstererek 10-15 grama kadar iner (106).

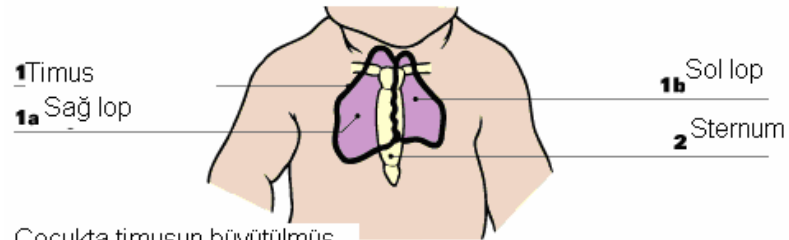
Anatomik konum olarak, sternumun arkasında üst mediastinuma yerleşik ve kapsülle sarılı iki loptan oluşan lenfoid bir organdır. Timusu saran konnektif doku orjinli kapsül, loblar içine trabeküla denilen uzantılar göndererek lobülleri oluşturur. Her lobül, korteks ve medulla olmak üzere iki bölgeye ayrılır (106). Lenfoid hücreler korteks kısmında yoğun, medullada seyrek. Timusa gelen ön lenfositler, korteksten medullaya geçerken, medullada bulunan epiteloid hücrelerin salgılarıyla olgunlaşarak T lenfositlere dönüşürler (174).

Hücresel tip immün cevapta etkili olan timusun (174) korteksini, esas itibarıyla, retiküler fibrillerle çevrili ve gelişmenin değişik evrelerinde bulunan lenfosit kümeleri (timositler) oluşturur. Medullada ise çoğunlukla epitelyal hücreler ve dağınık halde seyrek lenfositler bulunur. Bunlar olgun T lenfositleridir (106).

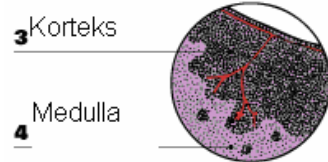


Şekil 3.6. Sıçanda timus bezinin anatomik konumu.

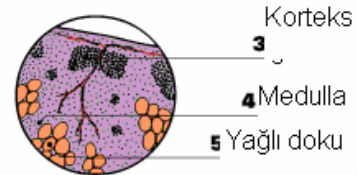
Çocukta timusun önden görünüşü



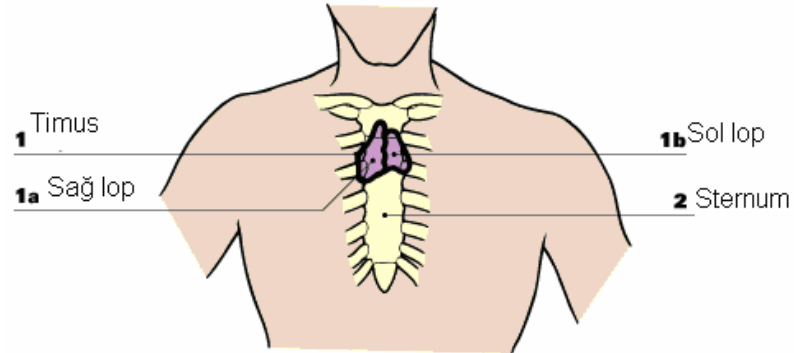
Çocukta timusun büyütülmüş kesiti



Yetişkinde timusun büyütülmüş kesiti



Yetişkinde timusun önden görünüşü



Şekil 3.7. İnsan timus bezinin çocuk ve erişkinlerdeki görüntüsü (11).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Deney hayvanları

Çalışmada, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (FÜTDAM) sağlanan, 220-250 gr ağırlığında 21 adet Wistar Albino cinsi intak erkek sıçanlar kullanıldı.

4.2. Deney hayvanlarının bakım ve beslenmeleri

Tüm hayvanlar 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ve standart oda sıcaklığı (21°C) sağlanan ortamda, her gün temizlenen kafeslerde tutuldu. Hayvanlar normal musluk suyu ve Elazığ Yem Fabrikası'nda hazırlanan pelet halindeki özel sıçan yemleriyle beslendi (Tablo 4.1).

Kuru madde (%)	93,69
Ham protein (%)	34,15
Ham yağ (%)	3,00
Metabolik enerji (Kkal/kg)	2095
Kalsiyum (%)	3,36
Sodyum (%)	1,09
Magnezyum (%)	0,50
Çinko (mg/kg)	286,80
Bakır (mg/kg)	29,33
Ham maddeler	Balık unu, mısır, buğday, ayçiçeği küspesi, çavdar ve mineral maddeler

Tablo 4.1: Sıçan yeminin bileşimi

4.3. Deney protokolü

Deney hayvanları kontrol (herhangi bir işlem yapılmayacak grup (n=7)), Pnx (pineal bezleri cerrahi yöntemle çıkarılacak grup (n=7)) ve Sham-Pnx grubu (pineal bezin alınması safhasına kadar Pnx grubuna uygulanan cerrahi işlemlerin uygulanacağı grup (n=7)) olmak üzere üçe ayrıldı. Pnx grubu ise, 24-Well plate’de Pnx, Pnx+10 μ M MT ve Pnx+100 μ M MT eklenecek kültür ortamı olmak üzere kendi arasında üçe ayrıldı ve 96-Well plate’nin kuyucuklarına belirlenen sıra ile aktarıldı.

4.4. Anestezi

Pnx ve Sham-Pnx grubundaki hayvanlar kas içi 60 mg/kg ketamin (Eczacıbaşı İlaç San. ve Tic. A.Ş. İstanbul, Türkiye) ve 5 mg/kg rompun (Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti. İstanbul, Türkiye) kombinasyonu ile genel anesteziye alındı.

4.5. Pinealektomi operasyonu

Genel anestezi altındaki sıçanlar sterotaksik cihaza (Stoelting Co, Illinois, ABD) yerleştirildi. Kafatası derisi traş edilerek iyotlu solüsyonla temizlendikten sonra longitudinal olarak oksipital çıkıntıya kadar orta hatta 1.75 cm’lik bir ensizyon yapıldı. Sagital ve lambdoid süturların bulunduğu kemiklerin periostları temporal kaslara ulaşınca kadar kazındı. Transfers ve sagital sinusların birleşme noktasının sağ tarafından, dişçi turu yardımıyla 3-4 mm çapında oval kemik parçası kesilerek çıkarıldı. Hassas bir şekilde beyin zarı delinerek ince uçlu bir pens, 60 derecelik bir açıyla, bu bölgeden içeriye yatay olarak yaklaşık 3-5 mm

ilerletildi. Pineal sap koparılarak pineal bez çıkarıldı. Kafatası derisi 4/0 ipek iplikle dikildi. Sham-Pnx operasyonu da pineal bezin çıkarılma safhasına kadar aynı yöntemle yapıldı. İyileşme süresi için sıçanlar iki hafta uygun ortamda bekletildi.

4.6. Kullanılan kimyasal maddeler ve kitler

RPMI-1640 ve New Born Calf Serum (FCS), Biological Industries (İsrail), Penicilin / streptomycin, Mediatech Collegro (VA, AK, HI, ABD), IFN- γ , IL-4 ve IL-10 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) kitleri de Cytimmune Sci. Inc.'den (College Park, Maryland, ABD) sağlandı. Kullanılan diğer tüm kimyasal maddeler ise Sigma Chemical Co.'dan (St. Louis, MO, ABD) temin edildi.

4.7. Timus hücrelerinin elde edilmesi

Sıçanlar servikal dislokasyonla öldürüldükten sonra özel kauçuk diseksiyon platformuna sırt üstü yatırılıp ön ve arka ayaklarından sabitlendi. Daha sonra göğüs kafesinin bittiği kısımdan itibaren, cerrahi bir makasla sırasıyla deri, kas dokusu, diyafram ve bilateral olarak kaburgalar kesildi. Kesilen göğüs kafesi yukarıya doğru kaldırılarak timus bezinin ortaya çıkması sağlandı. Uygun bir pens yardımıyla timus lobları total olarak alındı ve RPMI-1640 solüsyonu içeren bir petri kabına konuldu. Timus bezi, diğer doku parçacıkları ve kan pıhtısından arındırıldıktan sonra, yine RPMI-1640 solüsyonu içeren ayrı bir petri kabına aktarıldı. Temizlenmiş olan timus bezleri iki adet mikroskop lamı arasında ezilerek, timus hücrelerinin RPMI-1640 solüsyonu içerisine geçmesi sağlandı.

4.8. Timus hücre kültürünün hazırlanması

RPMI-1640 solüsyonu içerisine nüfuz etmiş timositler thoma lamında sayılarak, hücre sayısı 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı. Bunun için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Hücre sayısı} = \frac{\text{Sayılan hücre sayısı} \times 10^6}{\text{İstenen hücre sayısı} \times 10^4}$$

Daha sonra aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi:

- 1- Hücre solüsyonu 62 µm'lik naylon filtreden geçirilerek büyük falcon tüplerine aktarıldı.
- 2- Büyük falcon tüpündeki hücre kültürü solüsyonu, Concanavalin A(Con A) eklenecek ve eklenmeyecek şekilde ayrılmış olan küçük falcon tüplerine eşit şekilde bölüştürüldü.
- 3- Tüpler. +7°C'de 2000 rpm devirde 15 dakika santrifüj edildi.
- 4- Üstte kalan RPMI-1640, aynı miktarda kültür medyumuyla (1000 ml RPMI-1640 içerisinde, 2 mM L-Glutamine (yoksa), 20mM HEPES (yoksa), %10 FCS, %1 Penicilin/streptomycin) değiştirildi (119).
- 5- T hücre mitojeni olan Con A (115), 10 µg/ml dozda ayrı bir şişede hazırlanarak, Con A içerecek olan tüplere konuldu.
- 6- Dikkatli bir şekilde tritürasyon işlemi yapıldı

Bu işlemleri takiben 24-Well platelerin (TRP, İsviçre) her kuyucuğuna hazırlanan hücre süspansiyonundan 1 ml (1×10^6 hücre) konuldu. Sonra 10 mM ve 100 mM'lık konsantrasyonda hazırlanmış MT'den kuyucuklara 1µl eklenerek, çalışmada MT için belirlenen 10µl ve 100µl'lik final konsantrasyonları elde

edilmiş oldu. MT konulurken her seferinde pipet uçları değiştirildi. Bu uygulamaya deneyin bütün safhalarında dikkat edildi.

Başlangıç örnekleri, önceden belirlenmiş sıra ve konsantrasyonlara göre alındıktan sonra, plateler Heraeus marka (Hera Cell, Almanya) %5 CO₂ -%95 O₂ inkübatörüne yerleştirildi. Alınan numuneler ise, IL-4, IL-10 ve IFN- γ analizleri için -20°C’de muhafaza edildi. İnkübatördeki 24-Well plate’lerden bir sonraki gün 24. saat numuneleri alındı ve ELISA analizleri için numuneler yine -20°C’ye yerleştirildi.

Hücre solüsyonlarının hazırlanmasından, başlangıç ve 24. saat örneklerinin alınmasına kadar geçen bütün aşamalar, steril Class II Laminair Flow (Biolaf, Ankara) içerisinde gerçekleştirildi.

4.9. IL-4, IL-10 ve IFN- γ seviyelerinin belirlenmesi

Rat IL-4, IL-10 ve IFN- γ ELISA analizleri Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi. Analizlere başlamadan önce -20°C’de bulunan numuneler ve ELISA kitinin oda ısısına gelmesi beklendi.

4.9.1. ELISA solüsyonlarının hazırlanması

Yıkama solüsyonu, 80 ml Wash Buffer’e 2000 ml distile su oranına uygun olarak, yeterli miktarda hazırlandı. Streptavidin-HRP’den 120 μ l alınıp, 12 ml streptavidin-HRP diluent ile karıştırıldı ve Streptavidin-HRP Working solüsyonu elde edilmiş oldu. Standart Diluent Buffer ile standartlar (Recombinant rat IFN- γ , IL-4 ve IL-10) karıştırılıp, vortekslendi ve 10 dakika dinlendirildi. Hazırlanan

standartlar, deney tüplerine konuldu ve IFN- γ için, 700, 350, 175, 87.5, 43.7, 21.8 ve 0.0; IL-4 için, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 ve 0.0; IL-10 için ise 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 ve 0.0 olacak şekilde Assay Diluent ilave edilerek ayarlandı.

4.9.2. ELISA analiz prosedürü

Solüsyonlar hazırlanırken, oda ısısına gelmesi için çözünmeye bırakılan örnekler hazır hale geldikten sonra, her bir sitokin için kılavuzda belirtilen prosedürlere göre aşağıdaki uygulamalar yapıldı.

- 1- En yüksek standarttan başlanarak 96-Well plate'nin uygun kuyucuklarına 100 μ l konuldu.
- 2- Kültür örneklerinden ise daha önce belirlenmiş olan sırayla kuyucuklara 50 μ l ilave edildi.
- 3- Standart Diluent Buffer'dan ve Biotin Conjugate'dan, IL-4 ve IL-10 plate'lerine 50 μ l eklendikten sonra plate, asetat plate kaplayıcı ile kaplandı ve oda ısısında 2 saat bekletildi.
- 4- IFN- γ örnekleri ise 37 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra, hazırlanmış olan yıkama solüsyonu ile ELP40 marka otomatik plate yıkayıcısında (BIO-TEC Instruments, Inc., Vermont, ABD) 2x4 kez yıkama yapıldı ve Biotin Conjugate'dan 100 μ l eklendi. Bu aşamadan sonra plate, tekrar 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
- 5- Streptavidin–HRP Working solüsyonundan 100 μ l eklendikten sonra, IL-4 ve IL-10 örnekleri oda ısısında 30 dakika, IFN- γ örnekleri ise 37 °C'de 45 dakika inkübe edildikten sonra tekrar yıkama solüsyonuyla 2x4 kez yıkama yapıldı.

- 6- Stabilized Chromogen'den de 100 µl eklendikten sonra plate'ler oda ısısında 30 dakika bekletildi (IFN- γ örnekleri için ise bu süre 20 dakika olarak uygulandı).
- 7- İnkübasyondan sonra 100 µl Stop solüsyon ilave edilerek, plateler ELX 800 Universal marka bir plate okuyucusunda (BIO-TEC Instruments, Inc. Vermant, ABD) uygun program seçilerek 450 nm dalga boyunda okutuldu. Analiz prosedürü esnasında bütün bekleme süreleri karanlıkta geçirildi ve plate'ler bu esnada asetat plate kaplayıcısıyla kaplanarak muhafaza edildi.

4.10. İstatistiksel değerlendirme:

Bulguların istatistiksel değerlendirmesi bilgisayar ortamında SPSS 12.0 for Windows programında yapıldı. Sitokin bulguları One-way ANOVA testi kullanılarak hesaplandı ve tüm sonuçlar Ortalama $\pm$ SH olarak gösterildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

Kontrol grubuna göre, Pnx ve Pnx+10 μ M MT ilave edilmiş timus hücre kültürlerinde IFN- γ seviyesi Con A'sız (Şekil 5.1.a) ve Con A ile uyarılmış (Şekil 5.1.b) 24. saat örneklerinde anlamlı olarak arttı. Aynı şekilde IL-10 seviyesi Pnx ve Pnx+10 μ M MT ilave edilmiş timus hücre kültürlerinde Con A'sız (Şekil 5.2.a) ve Con A ile uyarılmış (Şekil 5.2.b) 24. saat örneklerinde anlamlı olarak azaldı. IL-4 için ise hem Con A'sız (Şekil 5.3.a) hem de Con A ile uyarılmış (Şekil 5.3.b) gruplarda 0 (başlangıç) ve 24. saat örneklerinde hiçbir anlamlı değişiklik tespit edilmedi. Pnx, Pnx+10 μ M MT ve Pnx+100 μ M MT grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise Pnx+100 μ M MT grubunda IFN- γ seviyesi hem Con A'sız (Şekil 5.1.a) ve hem de Con A ile uyarılmış (Şekil 5.1.b) 24. saat örneklerinde, Pnx grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Ayrıca IL-10 seviyesinin de Pnx+100 μ M MT grubunda Con A ile uyarılmış (Şekil 5.2.b) 24. saat örneklerinde, Pnx grubuna göre anlamlı şekilde artış gösterdiği belirlendi.

Başlangıç (0 saat) örneklerinde, hem Con A'sız (Şekil 5.1.a, 5.2.a, 5.3.a) hem de Con A ile uyarılmış (şekil 5.1.b, 5.2.b, 5.3.b) gruplarda; IFN- γ , IL-10 ve IL-4 için anlamlı değişiklik oluşmadı.

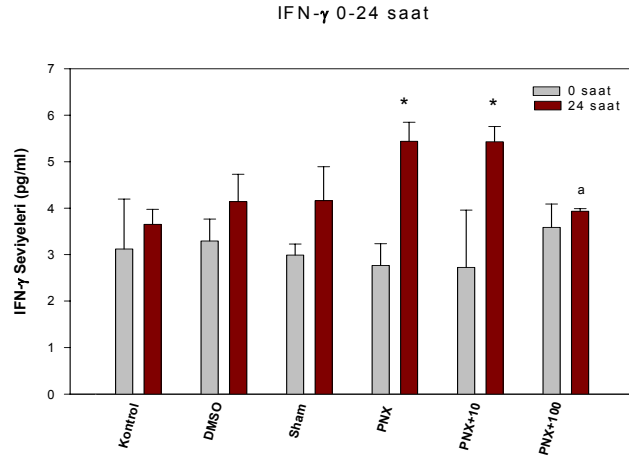
IFN- γ SONUÇLARI (pg/ml)

Con A ile indüklenmemiş						
Zaman (saat)	Kontrol	DMSO	SHAM	PNX	PNX+10 μ M MT	PNX+100 μ M MT
0	3.12 $\pm$ 1.07	3.29 $\pm$ 0.47	2.99 $\pm$ 0.24	2.77 $\pm$ 0.47	2.72 $\pm$ 1.24	3.59 $\pm$ 0.5
24	3.65 $\pm$ 0.33	4.14 $\pm$ 0.59	4.16 $\pm$ 0.73	5.44 $\pm$ 0.41 [*]	5.43 $\pm$ 0.32 [*]	3.93 $\pm$ 0.05 ^a
Con A ile indüklenmiş						
0	10.69 $\pm$ 0.61	10.09 $\pm$ 1.43	10.06 $\pm$ 1.04	9.20 $\pm$ 0.58	10.14 $\pm$ 0.67	9.61 $\pm$ 1.91
24	11.04 $\pm$ 0.79	12.14 $\pm$ 1.24	11.32 $\pm$ 0.62	15.06 $\pm$ 0.27 [*]	14.45 $\pm$ 0.28 [*]	12.35 $\pm$ 0.92 ^a

Tablo 5.1. 10 μ g/ml Con A içeren ve içermeyen kültür medyumunda, 0 (başlangıç) ve 24 saat sonra kontrole göre IFN- γ seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler (^{*} : Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^a : Pnx, Pnx+10 ve Pnx+100 μ M MT grupları arasında ; p<0.05, One-Way ANOVA).

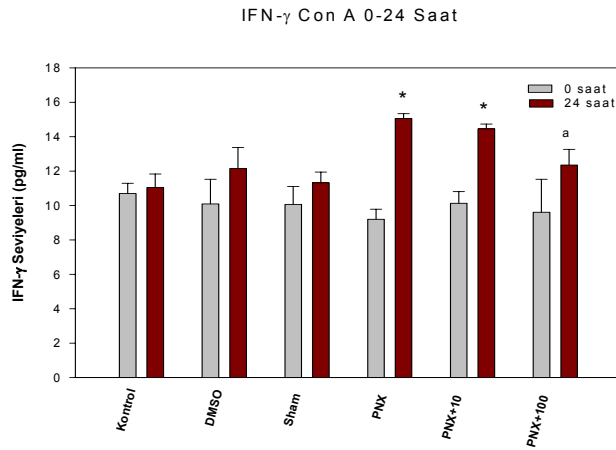
5.1. IFN- γ sonuçları

A



Şekil 5.1.A. : 0 (başlangıç) ve 24 saat sonra kontrole göre Con A ilave edilmemiş sıçan timus hücre kültürlerinin IFN- γ seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler (*: Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^a: Pnx, Pnx+10 ve Pnx+100 gruplarıyla karşılaştırıldığında; p<0.05, One-Way ANOVA).

B



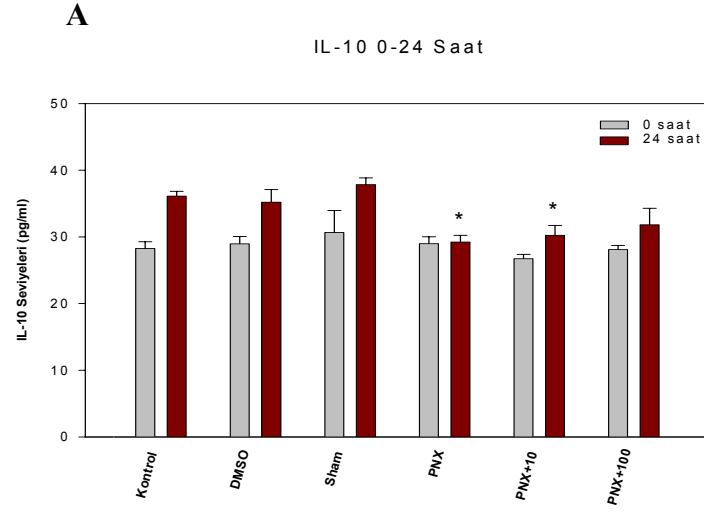
Şekil 5.1.B. : 0 ve 24 saat sonra kontrole göre 10 μ g/ml Con A ilave edilmiş sıçan timus hücre kültürlerinin IFN- γ seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler (*: Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^a: Pnx, Pnx+10 ve Pnx+100 gruplarıyla karşılaştırıldığında; p<0.05, One-Way ANOVA).

IL-10 SONUÇLARI (pg/ml)

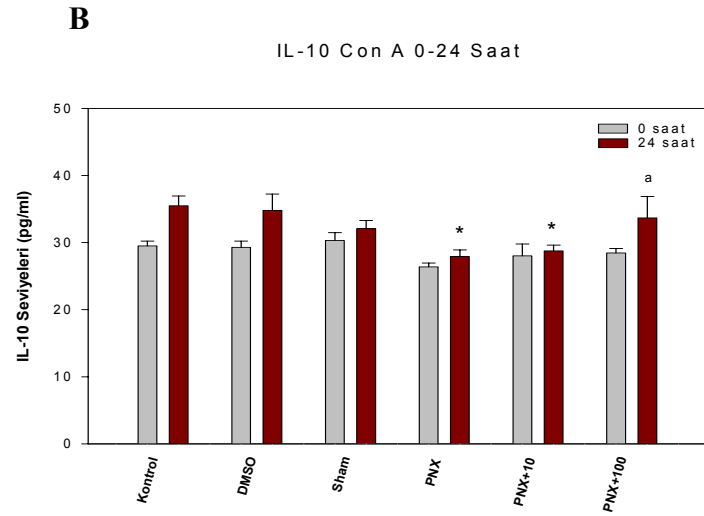
Con A ile indüklenmemiş						
Zaman (saat)	Kontrol	DMSO	SHAM	PNX	PNX+10µM MT	PNX+100µM MT
0	28.28±0.99	28.97±1.09	30.68±3.27	28.98±1.03	26.73±0.65	28.10±0.62
24	36.10±0.72	35.21±1.88	37.85±1.02	29.18±1 [*]	30.24±1.47 [*]	31.81±2.49
Con A ile indüklenmiş						
0	29.49±0.73	29.27±0.95	30.33±0.15	26.37±0.57	28.03±1.76	28.44±0.69
24	35.48±1.45	34.80±2.42	32.08±1.2	27.93±0.98 [*]	28.77±0.85 [*]	33.66±3.21 ^a

Tablo 5.2. 10 µg/ml Con A içeren ve içermeyen kültür medyumunda, 0 (başlangıç) ve 24 saat sonra kontrole göre IL-10 seviyelerinde meydana gelen (Ort ± SH) değişiklikler (*: Kontrol ile karşılaştırıldığında, ^a: Pnx µM MT ve Pnx+10 µM MT gruplarıyla karşılaştırıldığında; p<0.05, One-Way ANOVA).

5.2. IL-10 sonuçları



Şekil 5.2.A. : 0 ve 24 saat sonra kontrole göre Con A ilave edilmemiş sıçan timus hücre kültürlerinin IL-10 seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler (* $p < 0.05$, One-Way ANOVA).

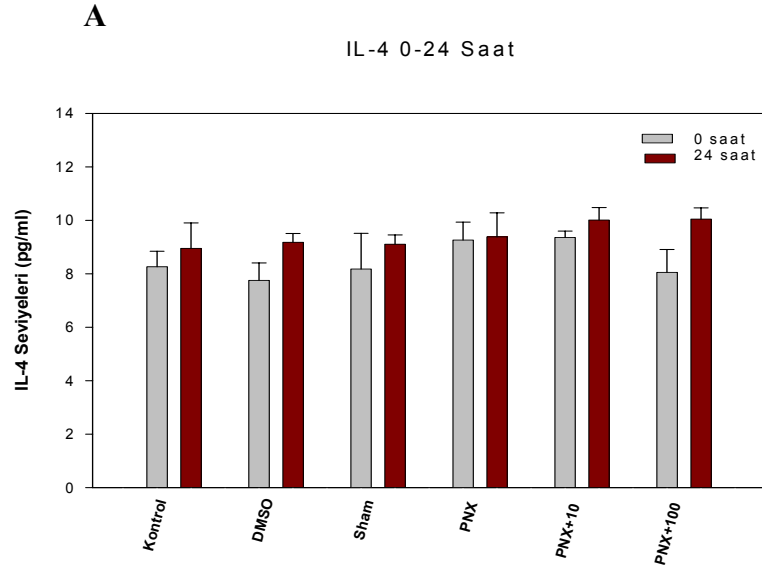


Şekil 5.2.B. : 0 ve 24 saat sonra kontrole göre 10 μ g/ml Con A ilave edilmiş sıçan timus hücre kültürlerinin IL-10 seviyelerinde meydana gelen (Ort $\pm$ SH) değişiklikler (^a: Pnx, Pnx+10 ve Pnx+100, ^{a,*} $p < 0.05$, One-Way ANOVA).

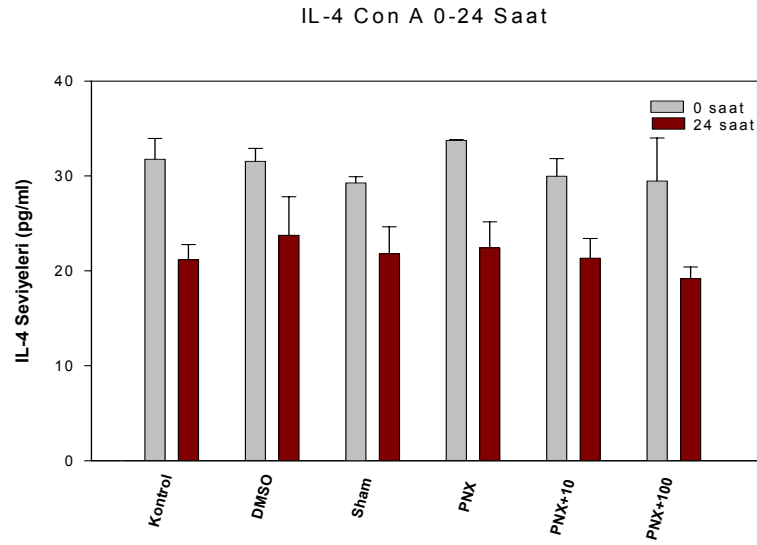
IL-4 SONUÇLARI (pg/ml)						
Con A ile indüklenmemiş						
Zaman (saat)	Kontrol	DMSO	SHAM	PNX	PNX+10µM MT	PNX+100µM MT
0	8.26±0.58	7.75±0.66	8.18±1.33	9.26±0.67	9.36±0.24	8.05±0.86
24	8.95±0.95	9.18±0.33	9.11±0.35	9.38±0.9	10.01±0.46	10.05±0.42
Con A ile indüklenmiş						
0	31.75±2.21	31.54±1.36	29.27±0.66	33.73±0.1	29.98±1.85	29.47±4.54
24	21.17±1.6	23.75±4.06	21.80±2.85	22.42±2.76	21.33±2.08	19.18±1.23

Tablo 5.3. 10 µg/ml Con A içeren ve içermeyen kültür medyumunda, 0 (başlangıç) ve 24 saat sonra kontrole göre IL-4 seviyelerinde meydana gelen (Ort ± SH) değişiklikler.

5.3. IL-4 sonuçları



Şekil 5.3.A. : 0 ve 24 saat sonra kontrole göre Con A ilave edilmemiş sıçan timus hücre kültürlerinin IL-4 seviyelerinde anlamlı değişiklik meydana gelmemiştir



Şekil5.3.B. : 0 ve 24 saat sonra kontrole göre 10 µg/ml Con A ilave edilmiş sıçan timus hücre kültürlerinin IL-4 seviyelerinde anlamlı değişiklik meydana gelmemiştir.

6. TARTIŞMA

İmmün sistemin ana unsurlarından biri olan timus bezinde (27), MT reseptörlerinin mevcut olduğu bilinmektedir (133). Daha önceki çalışmaların Pnx yapılmış sıçanlarda timus bezinin yapısal olarak bir değişiklik gösterdiğini (170), yaşlı farelerde (191) ve Pnx yapılmış sıçanlarda (170) MT tedavisi veya pineal greft uygulamasının (191) timus bezinde involüsyonu önlediğini bildirmesi, pineal bezin immün sistemi etkilediği görüşüne destek sağlamıştır (124, 140, 195).

Organizmanın çevresel değişikliklere karşı uyumlu cevabı için nöroendokrin ve immün sistem arasındaki etkileşim önemlidir. Bu ilişkide pineal bezden salgılanan bir nörohormon olan MT önemli rol oynar (83, 135, 140). Uzun zamandan beri MT ve immün sistem arasındaki ilişkiyi açıklayabilmek için çalışmalar yapılmaktadır (195). Yapılan araştırmalarda MT'nin immün sistemi uyarıcı bir etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur (43, 137, 140, 195).

Günümüzde, bireysel toleransı (self-tolerance) koruma ve etkili bir immün cevap oluşumu için büyük öneme sahip olan Th1 ve Th2 lenfositlerden salınan sitokinler vasıtasıyla immün dengenin düzenlendiği görüşü ağırlıklı olarak kabul görmektedir (165). İmmün sistemin sağlıklı olarak işleyebilmesi için Th1 ve Th2'nin denge durumunda olması gerekmektedir (140, 165). Hücresel immün cevabı belirten Th1 grup sitokini IFN- γ ile humoral immün cevabı gösteren IL-4 ve IL-10 (Th2 sitokinleri) bu dengenin sağlıklı işleyişi hakkında fikir vermektedir (219). Th1 ve Th2 dengesini etkileyen farklı hastalık durumlarının yanı sıra; bu sitokin gruplarının birbirleri üzerinde de etkileri olduğu bilinmektedir. Th1 hücre sitokini olan IFN- γ , Th2 hücrelerinin gelişimi ve aktivasyonunu baskımlarken; Th2

hücrelerinin ürettiği IL-10 (67, 144) ve IL-4 de, Th1 hücrelerinin gelişimi ve aktivasyonu üzerinde negatif etki oluşturmaktadır (68, 179).

Otoimmün hastalıkların fizyopatolojisinde Th1 ya da Th2 hücrelerinden salınan sitokinlerin baskınlığının kritik öneme sahip olduğunu gösteren çalışma sonuçları giderek artmaktadır (93). Th1/Th2 dengesi üzerine MT'nin etkisinin nasıl olduğu tam olarak açıklanmış değildir. Gerek immün sistemi etkileyen hastalıklara karşı, gerekse otoimmün hastalıkların fizyopatolojilerinin anlaşılabilmesi ve tedavisine yönelik olarak klinik uygulamaya konulabilmesi açısından MT'nin etkisine dair yapılan çalışmalardan çelişkili sonuçlar elde edilmiş olması, pineal bezin etkisini tam olarak yansıtacak çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir (140).

Otoimmün hastalıkların görülme sıklığında meydana gelen artış, immün sistemi etkilediği bilinen MT'nin tedavideki rolünün belirlenebilmesi açısından birçok çalışma yapılmasına neden olmuştur. Ancak, MT'nin etkisine yönelik henüz net bir sonuç elde edilememiştir. Bazı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda MT ile inkübasyonu takiben IFN- γ 'nın seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (14, 56, 66). Fakat, daha sonraki çalışmalarda MT'nin IFN- γ üretimini artırdığı (43, 51, 71, 140, 222), bununla birlikte IL-10 seviyesini baskıladığı ve IL-4 üretimine ise etki etmediği bildirilmiştir (242).

Çalışmamızda, Pnx+10 μ M MT ilave ettiğimiz grupta IFN- γ seviyesinin artması, IL-10 seviyesinin azalması ve IL-4 seviyesinde de herhangi bir değişiklik görülmemesi bu çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur. Ancak, Pnx yaptığımız grupta da aynı sonuçların elde edilmesi, MT'nin Th1/Th2 dengesi üzerine olan etkisini belirleyebilmek için pineal bezdeki mevcut diğer indol ve peptidlerle

MT'nin etkileşiminin belirlenmesi gerektiğine dair düşüncelerimizi doğrulamaktadır. Pineal bezden, 5-metoksitriptamin ve 5-metoksitriptafol'ü kapsayan indollerin yanı sıra (130) adrenalin, noradrenalin, serotonin, histamin, inositol, taurin gibi maddeler ve arginin vasotocin, angiotensin I, lipotropinler ve enkefalinler gibi peptidler de salınmaktadır (120). MT ve pineal bezdeki mevcut olan bu maddelerin etkileşimine yönelik olarak yapılan çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu konuyla ilgili olarak yapılan bir çalışmada, MT ve 5-metoksitriptamin'in sekresyonunun sirkadiyan ritminin birbirine benzerlik gösterdiği, 5-metoksitriptafol'ün sirkadiyan ritminin ise MT ile zıt bir şekilde günün ışık fazında doruk noktaya ulaştığı bildirilmektedir. Sirkadiyan ritimleri zıt olmasına karşın sitokinler üzerine olan etkileri bakımından ise MT ve 5-metoksitriptafol'ün büyük benzerlik gösterdiği (130), özellikle kanser tedavisinde MT'nin kullanılmasının düşünüldüğü durumlarda methoxytryptophol'ün de bu tedaviye katılmasıyla, karanlık periyot süresince MT'nin antitümöral etkisi ve gündüz ışık fazı süresince de methoxytryptophol'ün antitümöral etkisi neticesinde daha verimli bir sonuç elde edilebileceği ifade edilmektedir (127).

Yukarıda ileri sürdüğümüz hipotezimizle ilgili olarak, in vitro şartlarda yapılan çalışmalarda MT'nin NK hücre aktivitesini, IFN- γ ve TNF'nin DNA sentezini ve T lenfositlerinin çoğalmasını baskıladığı tespit edilmiştir (56, 123, 124, 180). Pnx+10 μ M MT grubunda elde ettiğimiz bulgular bu literatürlerle uyumludur. Bununla birlikte çalışmamızda endojen MT ile birlikte diğer pineal indol ve peptidleri de uzaklaştırdığımız Pnx grubunda ve Pnx+10 μ M MT grubunda IFN- γ ve IL-10 ile elde edilen sonuçlarımız, MT ile diğer indol ve peptidlerin etkileşim içinde bulunabileceği tezimizi kuvvetlendirmektedir.

Pnx, Pnx+10 μ M MT ve Pnx+100 μ M MT eklenen gruplar kendi aralarında kıyaslandığında hem Con A ile indüklenmiş hem de Con A ile indüklenmemiş Pnx+100 μ M MT eklenen gruptaki IFN- γ seviyesinin Pnx grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olması ve kontrol değerine yakın bulunması; yine IL-10 seviyesinin de Con A ile indüklenmiş Pnx+100 μ M MT eklenen grupta Pnx grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak artmış olması ve kontrol grubu değerlerine yaklaştığının tespit edilmesi, MT'nin etkisinin doza bağımlı olarak değişebildiğini göstermektedir. Bizim sonuçlarımızla ilgili olarak, 1994 yılında yapılan bir *in vitro* çalışmada, MT'nin fizyolojik konsantrasyonlarda IFN- γ ve TNF- α üretimini indüklediği fakat doza bağımlı olarak bu sitokinlerin üretimini inhibe ettiği ifade edilmiştir (56).

Pnx grubumuzda IFN- γ seviyesinin yükselmesi ve bununla ilişkili olarak IL-10 seviyesinin azalması nedeniyle, pineal bezin total etkisinin humoral immün cevabı stimüle etme şeklinde olabileceği kanaatine varılmıştır. Ayrıca Pnx grubuna ilave edilen MT'nin, kontrol grubuyla kıyaslandığında, bu etkiyi doz bağımlı bir şekilde geriye döndürmesi nedeniyle, MT'nin etkisinin de bu yönde olabileceği düşünülmektedir. Th1/Th2 dengesi üzerine MT'nin etkisini belirlemeye yönelik olarak yapılan çalışmalarda *in vitro* ve *in vivo* şartlarda farklı sonuçlar elde edilmesiyle ilgili olarak, *in vivo* nöroendokrin hormonlarla MT'nin direkt olarak etkileşimi üzerinde durulmaktadır (113, 183). Bu nedenle, MT ile diğer nörohormonların, pineal beze ait indol (130) ve peptidlerin (120) etkileşimini belirleyebilmek için daha ileri düzeyde *in vitro* ve *in vivo* şartlarda düzenlenmiş çalışmalara gereksinim vardır.

MT'nin immün sistem üzerine etkisini belirlemede, *in vitro*  artlarda yapılan deneylerden MT'nin etkisine yönelik olarak spesifik etki belirlenirken; *in vivo*  artlarda ise MT'nin nöroendokrin hormonlar ve diğ r maddelerle etkileşimi tespit edilerek, sistemik etki hakkında fikir sahibi olunmaktadır. Bununla birlikte, çalışılan kültür ortamındaki farklılıkların da sonuca yansıyabileceği ihtimali unutulmamalıdır. Konuyla ilgili olarak yapılan çalışmaların büyük bir kısmı PBMC kültürlerinde yapılmıştır. Bizim  alı mamızda ise, immün sistemin temel elemanlarından biri olan ve T hücrelerinin farklılaşması ve bir takım özel seleksiyonlara tutulmasını (27) kapsayan fonksiyonlara sahip olan timus bezi primer hücre kültürü kullanılmıştır. Bu nedenle PBMC kültürleri ile timus hücre kültüründe yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilebilir. Ayrıca, PBMC hücrelerini teşkil eden lenfosit ve monositlerin bile MT'ye duyarlılıkta farklı özelliklere sahip olduğu, MT'nin etkilerine monositlerin lenfositlere göre nispi olarak daha duyarlı olabileceği rapor edilmiştir (19, 155). Burada önemli olan immün sistemin i leyi i hakkında fikir sahibi olunabilecek uygun kültür ortamını seçmektir. İmmün sistemin primer elemanı olan ve T lenfositlerinin olgunlaşmasını sağlayan timus bezinden elde edilecek bulguların, periferdeki mononükleer hücrelerden elde edilecek sonuçlardan daha net fikir sahibi olunmasını sağlayabilir.

Sitokinler ve MT etkileşimine yönelik olarak sağlık ve hastalık durumunda farklı sonuçlar elde edilebilmektedir (128, 169). AIDS'li hastalarda bazı sitokin seviyelerinin ve MT'ye bağlı ritim gösterip göstermediğini tespit etmek amacıyla yapılan çalışmadan elde edilen bulgular (169), sağlam bireyler üzerinde yapılan çalışmadaki bulgularla (128) farklılık göstermektedir. Bu da hastalık ve sağlık

durumunda sitokin-MT etkileşiminin farklı yönde olabileceğini akla getirmektedir. Sitokinlerin hipotalamus-hipofiz-adrenal axis dışındaki hormonların sekresyonunu düzenleyebileceğinden de bahsedilmektedir. Örneğin, IFN- γ , G-CSF ve GM-CSF'ün pineal bezden MT'nin salınımını uyarıcı etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (252, 260). Son zamanlarda lenfositlerin de MT salgıladıkları ifade edilmektedir (44, 46).

Bütün bu veriler ışığında, yaptığımız çalışma ile ilgili olarak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, hem Con A ile uyarılmış hem de Con A ile uyarılmamış 24. saat örneklerinde, Pnx grubunda IFN- γ seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artması ve IL-10 seviyesinin de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalması neticesinde, pineal bezin Th1/Th2 dengesi üzerine olan etkisinin Th2 cevabını stimüle etme şeklinde olduğu söylenebilir. Ayrıca, Pnx grubuyla, Pnx+10 μ M MT ve Pnx+100 μ M MT eklenen gruplar karşılaştırıldığında ise, MT'nin IFN- γ düzeyini 10 μ M ve 100 μ M dozlarda Pnx grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskıladığı görülmüştür. IL-10 düzeyi ise Pnx grubuyla kıyaslandığında MT'nin 10 μ M ve 100 μ M dozlarda Pnx grubunda azalmış olan IL-10 seviyesini artırdığı gözlenmiş ve bu artış 10 μ M MT için hem Con A ile uyarılmış hem de uyarılmamış gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, 100 μ M MT dozdaki artış ise sadece Con A ile uyarılmış grupta istatistiksel olarak anlamlıdır. Elde ettiğimiz bulgulara dayanarak, MT'nin Th1/Th2 dengesini Th2 yönüne polarize ettiği kanaatine varılmıştır. Bu sonuçlar MT'nin Th2 cevabını artırdığını bildiren çalışmalarla uyumludur (14, 56, 123, 124, 180, 221). Ayrıca, MT'nin bu etkisini doz bağımlı bir şekilde gerçekleştiğini söyleyebiliriz. Konuyla ilgili olarak yapılan başka bir çalışmadan elde edilen

bulgular, MT'nin etkisinin doz bağımlı bir şekilde değiştiği şeklindeki ifademizi teyit eder niteliktedir (56).

Özetle, pineal bezin Th1/Th1 dengesi üzerinde düzenleyici bir etkiye sahip olduğu, pineal bezin yokluğunda bu dengenin humoral immün cevabın baskılanıp, hücrel immün cevabın artması şeklinde değiştiği ve MT'nin *in vitro* şartlarda doz bağımlı olarak bu etkiyi geriye döndürerek humoral immün cevabı stimule ettiği söylenebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Abbas AK, Burstein HJ, Bogen SA. (1994). Determinants of helper T cell-dependent antibody production. *Semin Immunol.* 5: 441-447.
2. Abbas AK, Lichtman AK, Rober JS. (1997). *Cytokines. Cellular and molecular immunology.* 3 th edition, Philedelphia: WB Saunders Company. 249-278.
3. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 383: 787-793.
4. Adam C, Tannery P. (1974). *Oeuvres de Descartes*, vol. XI, Librairie Philosophique J. Vrin, Paris.
5. Ahlborn F. (1884). Ueber die Bedeutung der Zirbeldrüse (Glandula pinealis; Conarium; Epiphysis cerebri), *Zschr wiss Zool.* 40: 331–337.
6. Akimoto S, Okumura A, Fuse H. (1998). Relationship between serum levels of interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha and bone turnover markers in prostate cancer patients. *Endocr J.* 45: 183-189.
7. Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. (2003). The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res.* 34: 1-10.
8. Anon. (2005). Melatonin and cancer treatment. Erişim: (<http://www.Lef.org/magazine/mag2004/images/jan2004-report-melatonin-02.jpg>). Erişim tarihi: 10.06.2005.
9. Anon. (2005). Pituitary and pineal glands. Erişim: (<http://www.Training.seer.cancer.gov/module-anatomy/images/illu-pituitary-pineal-glands.jpg>). Erişim tarihi: 10.06.2005.
10. Anon. (2005). Principles of endocrinology: Central endocrine glands. Erişim:(<http://www.colarado.edu/epop/epop1220lynch/image/figure18j.jpg>). Erişim tarihi: 10.06.2005.
11. Anon.(2006).Thymus Human. Erişim : (http://www.fofweb.com/Electronic_Images/onfiles/SciHumAnat11-10c.gif). Erişim tarihi:03.07.2006.
12. Arendt J. (1988). Melatonin. *Clin Endocrinol (Oxf).* 29: 205-229.
13. Arendt J. (1995). *Melatonin and the mammalian pineal gland.* Chapman&Hall, London.
14. Arzt ES, Fernandez-Castelo S, Finocchiaro LM, Criscuolo ME, Diaz A, Finkielman S, Nahmod VE. (1988). Immunomodulation by indoleamines: serotonin and melatonin action on DNA and interferon-gamma synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Immunol.* 8:513-520.
15. Attanasio A, Rager K, Gupta D. (1986). Ontogeny of circadian rhythmicity for melatonin, serotonin and N-acetylserotonin in humans. *J Pineal Res.* 3: 251-256.
16. Axelrod J. (1974). The pineal gland: A neurochemical transducer. *Science.* 184: 1341-1348.

17. Ayar A, Kutlu S, Yilmaz B, Kelestimur H. (2001). Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium in vitro. *Neuro Endocrinol Lett.* 22: 199-207.
18. Balkwill FR, Burke F. (1989). The cytokine network. *Immunol Today.* 10: 299-304.
19. Barjavel MJ, Mamdouh Z, Raghbate N, Bakouche O. (1998). Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J Immunol.* 160: 1191-1197.
20. Bartness TJ, Wade GN. (1985). Body weight, food intake and energy regulation in exercising and melatonin-treated Siberian hamsters. *Physiol Behav.* 35: 805-808.
21. Baydas G, Kutlu S, Naziroglu M, Canpolat S, Sandal S, Ozcan M, Kelestimur H. (2003). Inhibitory effects of melatonin on neural lipid peroxidation induced by intracerebroventricularly administered homocysteine. *J Pineal Res.* 34: 36-39.
22. Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem.* 269: 28531-28534.
23. Bernard M, Guerlotte J, Greve P, Grechez-Cassiau A, Iuvone MP, Zatz M, Chong NW, Klein DC, Voisin P. (1999). Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina. *Reprod Nutr Dev.* 39: 325-334.
24. Bettahi I, Guerrero JM, Reiter RJ, Osuna C. (1998). Physiological concentrations of melatonin inhibit the norepinephrine-induced activation of prostaglandin E2 and cyclic AMP production in rat hypothalamus: a mechanism involving inhibition of nitric oxide synthase. *J Pineal Res.* 25: 34-40.
25. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. (1998). Antioxidant properties of melatonin - an emerging mystery. *Biochem Pharmacol.* 56: 1265-1272.
26. Binkley S. (1988). *The Pineal: Endocrine and norendocrine function.* Prentice Hall. New Jersey.
27. Blackburn CC, Manley NR. (2004). Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat Rev Immunol.* 4:278-289.
28. Boztosun A, Kumru S, Gödekmerdan A. (2004). Rekürren spontan abortuslarda lenfosit subgrupları ve sitokinlerin rolünün araştırılması. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi.* 18: 147-155.
29. Brzezinski A. (1997). Melatonin in humans. *N Engl J Med.* 336: 186-195.
30. Bubenik GA, Pang SF. (1994). The role of serotonin and melatonin in gastrointestinal physiology: ontogeny, regulation of food intake, and mutual serotonin-melatonin feedback. *J Pineal Res.* 16: 91-99.
31. Bubenik GA. (2002). Gastrointestinal melatonin: localization, function and clinical relevance. *Dig Dis Sci.* 47: 2336-2348.
32. Buijs RM, Pevet P. (1980). Vasopressin- and oxytocin-containing fibres in the pineal gland and subcommissural organ of the rat. *Cell Tissue Res.* 205: 11-17.

33. Cagnacci A. (1996). Melatonin in relation to physiology in adult humans. *J Pineal Res.* 21: 200-213.
34. Calvo J, Boya J, Borregon A, Garcia-Maurino JE. (1988). Presence of glial cells in the rat pineal gland: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *Anat Rec.* 220(4): 424-428.
35. Calvo J, Boya J. (1984). Postnatal evolution of the rat pineal gland: light microscopy. *J Anat.* 138: 45-53.
36. Calvo J, Boya J. (1984). Ultrastructure of the pineal gland in the adult rat. *J Anat.* 138: 405-409.
37. Calvo J, Boya J. (1985). Ultrastructure of the rat pineal stalk. *Acta Anat.* 123: 172-177.
38. Calvo JL, Boya J, Garcia-Maurino JE. (1990). Ultrastructural changes in the rat pineal gland after sympathetic denervation. Quantitative study. *Histol Histopathol.* 5(2): 155-160.
39. Calvo JR, Rafii-el-Idrissi M, Pozo D, Guerrero JM. (1995). Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells. *J Pineal Res.* 18: 119-126.
40. Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ. (1972). Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology.* 91: 1213-1218.
41. Cardinali DP, Romeo HE. (1991). The autonomic nervous system of the cervical region as a channel of neuroendocrine communication. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 3: 278-297.
42. Carlson LL, Weaver DR, Reppert SM. (1989). Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Endocrinology.* 125: 2670-2676.
43. Caroleo MC, Frasca D, Nistico G, Doria G. (1992). Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. *Immunopharmacology.* 23: 81-89.
44. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia-Maurino S, Reiter RJ, Guerrero JM. (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 18:537-539.
45. Carrillo-Vico A, Garcia-Perganeda A, Naji L, Calvo JR, Romero MP, Guerrero JM. (2003). Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cell Mol Life Sci.* 60: 2272-2278.
46. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Calvo JR, Karasek M, Guerrero JM. (2005). Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:992-1000.
47. Cassone VM, Warren WS, Brooks DS, Lu J. (1993). Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. *J Biol Rhythms.* 8: 73-81.
48. Chaouat G, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Elliott JF, Mosmann T, Wegmann TG. (1995). IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating

- combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN-tau. *J Immunol.* 154: 4261-4268.
49. Chaouat G, Menu E, de Smedt D, Khrihnan L, Hui L, Assal Meliani A, Martal J, Raghupathy R, Wegmann TG. (1996). The emerging role of IL-10 in pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 35: 325-329.
 50. Cohen M, Roselle D, Chabner B, Schmidt TJ, Lippman M. (1978). Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature.* 274: 894-895.
 51. Colombo LL, Chen GJ, Lopez MC, Watson RR. (1992). Melatonin induced increase in gamma-interferon production by murine splenocytes. *Immunol Lett.* 33: 123-126.
 52. Costa EJ, Lopes RH, Lamy-Freund MT. (1995). Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res.* 19: 123-126.
 53. Costa EJ, Shida CS, Biaggi MH, Ito AS, Lamy-Freund MT. (1997). How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies. *FEBS Lett.* 416: 103-106.
 54. Del Gobbo V, Libri V, Villani N, Calio R, Nistico G. (1989). Pinealectomy inhibits interleukin-2 production and natural killer activity in mice. *Int J Immunopharmacol.* 11: 567-573.
 55. Del Zar MM, Martinuzzo M, Falcon C, Cardinali DP, Carreras LO, Vacas MI. (1990). Inhibition of human platelet aggregation and thromboxane-B2 production by melatonin: evidence for a diurnal variation. *J Clin Endocrinol Metab.* 70: 246-251.
 56. Di Stefano A, Paulesu L. (1994). Inhibitory effect of melatonin on production of IFN gamma or TNF alpha in peripheral blood mononuclear cells of some blood donors. *J Pineal Res.* 17:164-169.
 57. Djeridane Y, Vivien-Roels, B, Simonneaux V, Miguez J.M, Pevet P. (1998). Evidence for melatonin synthesis in rodent Harderian gland: a dynamic in vitro study. *J Pineal Res.* 25: 54-64.
 58. Dubocovich ML, Cardinali DP, Delagrange P, Krause DN, Strosberg, Sugden D, Yocca FD. (2001). Melatonin receptors, in *The IUPHAR Compendium of receptor characterization and classification*, 2 nd ed, IUPHAR Media, London. 271-277.
 59. Dubocovich ML, Masana MI, Jacob S, Sauri DM. (1997). Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 355: 365-375.
 60. Ebadi M, Govitrapong P, Phansuwan-Pujito P, Nelson F, Reiter RJ. (1998). Pineal opioid receptors and analgesic action of melatonin. *J Pineal Res.* 24: 193-200.
 61. Ebadi M, Samejima M, Pfeiffer RF. (1993). Pineal gland in synchronizing and refining physiological events. *NIPS.* 8: 30-33.
 62. Engler H, Stefanski V. (2003). Social stress and T cell maturation in male rats: transient and persistent alterations in thymic function. *Psychoneuroendocrinology.* 28: 951-969.

63. Erlich SS, Apuzzo ML. (1985). The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. *J Neurosurg.* 63: 321-41.
64. Farrar MA, Schreiber RD. (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol.* 11: 571-611.
65. Fawcett DW. (1997). *A Textbook of histology.* Philadelphia, WB Saunders Co. 6-49.
66. Finocchiaro LM, Arzt ES, Fernandez-Castelo S, Criscuolo M, Finkielman S, Nahmod VE. (1988). Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway. *J Interferon Res.* 8: 705-716.
67. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. (1989). Two types of Mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 170: 2081-2095.
68. Fitch FW, Mckisic MD, Lancki DW, Gajewski TF. (1993). Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu Rev Immunol.* 11: 29-48.
69. Forsling ML, Stoughton R, Kelestimir H, Kostoglou-Athanassiou I, Demaine C. (1996). Release of vasopressin in response to altered plasma volume and sodium concentrations following pinealectomy in the rat. *J Pineal Res.* 20: 211-216.
70. Forsling ML, Stoughton RP, Zhou Y, Kelestimir H, Demaine C. (1993). The role of the pineal in the control of the daily patterns of neurohypophysial hormone secretion. *J Pineal Res.* 14: 45-51.
71. Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM (1997). Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4⁺ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 159:574-581.
72. Garidou ML, Bartol I, Calgari C, Pevet P, Simonneaux V. (2001). In vivo observation of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the rat pineal complex. *Neuroscience.* 105: 721-729.
73. Gauer F, Masson-Pevet M, Pevet P. (1994). Differential regulation of melatonin receptors by short- versus long-term pinealectomy in the rat suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis. *J Pineal Res.* 16: 73-76.
74. Geenen V, Kecha O, Brilot F, Hansenne I, Renard C, Martens H. (2001). Thymic T-cell tolerance of neuroendocrine functions: physiology and pathophysiology. *Cell Mol Biol* 47: 179-88.
75. Girouard H, Chulak C, Lejossec M, Lamontagne D, de Champlain J. (2001). Vasorelaxant effects of the chronic treatment with melatonin on mesenteric artery and aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 19: 1369-1377.
76. Giusti P, Lipartiti M, Franceschini D, Schiavo N, Floreani M, Manev H. (1996). Neuroprotection by melatonin from kainate-induced excitotoxicity in rats. *FASEB J.* 10: 891-896.

77. Goldman H, Wurtman R. (1964). Flow of blood to the pineal body of the rat. *Nature*. 203: 87-88.
78. Golombek DA, Pevet P, Cardinali DP. (1996). Melatonin effects on behavior: possible mediation by the central GABAergic system. *Neurosci Biobehav Rev*. 20: 403-412.
79. Gonzalez-Haba MG, Garcia-Maurino S, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. (1995). High-affinity binding of melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4+). *FASEB J*. 9: 1331-1335.
80. Guerrero JM, Reiter RJ, Ortiz GG, Pablos MI, Sewerynek E, Chuang JI. (1997). Melatonin prevents increases in neural nitric oxide and cyclic GMP production after transient brain ischemia and reperfusion in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Pineal Res*. 23: 24-31.
81. Guerrero JM, Reiter RJ. (1992). A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr Res*. 18: 91-113.
82. Hakanson R, Owman C. (1966). Pineal dopa decarboxylase and monoamine oxidase activities as related to the monoamine stores. *J Neurochem*. 13: 597-605.
83. Haldar C, Singh R. (2001). Pineal modulation of thymus and immune function in a seasonally breeding tropical rodent, *Funambulus pennanti*. *J Exp Zool*. 289: 90-98.
84. Hamano K, Gohra H, Noda H, Katoh T, Fujimura Y, Zempo N, Esato K. (1998). Increased serum interleukin-8: correlation with poor prognosis in patients with postoperative multiple organ failure. *World J Surg*. 22: 1077-1081.
85. Hara M, Yoshida M, Nishijima H, Yokosuka M, Iigo M, Ohtani-Kaneko R, Shimada A, Hasegawa T, Akama Y, Hirata K. (2001). Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Pineal Res*. 30: 129-138.
86. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. (1993). The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev*. 17: 347-357.
87. Harman D. (1994). Free-radical theory of aging. Increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci*. 717: 1-15.
88. Hartmann L, Roger M, Lemaitre BJ, Massias JF, Chaussain JL. (1982). Plasma and urinary melatonin in male infants during the first 12 months of life. *Clin Chim Acta*. 121: 37-42.
89. Hauther G. (1994). Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact of nutritional factors on circulating melatonin. *Ann NY Acad Sci*. 719: 146-158.
90. Hedges SR, Sibley DA, Mayo MS, Hook EW 3rd, Russell MW. (1998). Cytokine and antibody responses in women infected with *Neisseria gonorrhoeae*: effects of concomitant infections. *J Infect Dis*. 178: 742-751.
91. Heresbach D, Letourneur JP, Bahun I, Pagenault M, Guillou YM, Dyard F, Fauchet R, Malledant Y, Bretagne JF, Gosselin M. (1998). Value of early blood Th-1 cytokine determination in predicting severity of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*. 33: 554-560.

92. Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S. (1974). In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem.* 249: 1311-1313.
93. Hollo K, Glant TT, Garzo M, Finnegan A, Mikecz K, Buzas E. (2000). Complex pattern of Th1 and Th2 activation with a preferential increase of autoreactive Th1 cells in BALB/c mice with proteoglycan (aggrecan)-induced arthritis. *Clin Exp Immunol.* 120: 167-173.
94. Ianas O, Olinescu R, Badescu I. (1991). Melatonin involvement in oxidative processes. *Endocrinologie.* 29: 147-153.
95. Jackson RL, Lovenberg W. (1971). Isolation and characterization of multiple forms of hydroxyindole-O-methyltransferase. *J Biol Chem.* 246: 4280-4285.
96. Jahnke G, Marr M, Myers C, Wilson R, Travlos G, Price C. (1999). Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci.* 50: 271-279.
97. Jansen JH, Fibbe WE, Willemze R, Kluin-Nelemans JC. (1990). Interleukin-4. A regulatory protein. *Blut.* 60: 269-274
98. Jeong HJ, Chung HS, An HJ, Kim JB, Lee EM, Park EJ, Jang CH, Hong SH, Kim HM. (2003). Immune-enhancement effect of the herbal combination *Allergina*. *Clin Chim Acta.* 337: 77-84.
99. Kappers JA. (1976). The mammalian pineal gland, a survey. *Acta Neurochir* 34: 109-149.
100. Karahasanoğlu AM, Özand PT. (1972). The purification and properties of bovine pineal S-adenosylmethionine: N-acetylserotonin O-methyl transferase. *J Neurochem.* 19: 411-430.
101. Katsikis PD, Cohen SB, Londei M, Feldmann M. (1995). Are CD4⁺ Th1 cells pro-inflammatory or anti-inflammatory? The ratio of IL-10 to IFN-gamma or IL-2 determines their function. *Int Immunol.* 7: 1287-1294.
102. Kauppila A, Kivela A, Pakarinen A, Vakkuri O. (1987). Inverse seasonal relationship between melatonin and ovarian activity in humans in a region with a strong seasonal contrast in luminosity. *J Clin Endocrinol Metab.* 65: 823-828.
103. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. (2002). *Tıbbi Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul.*
104. Keleştimur H. (1996). İnsanda pineal bezin fonksiyonları. *F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi.* 10: 141-147.
105. Keleştimur H. (1998). Pineal bez ve melatonin. *Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kurs Kitabı, Prof. Dr. Olcay Gedik. Pfizer.* 87-96.
106. Kılıçturgay K. (2003). *İmmünoloji. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul.*
107. Kivela A, Kauppila A, Leppaluoto J, Vakkuri O. (1990). Melatonin in infants and mothers at delivery and in infants during the first week of life. *Clin Endocrinol (Oxf).* 32: 593-598.
108. Kivela A, Kauppila A, Ylostalo P, Vakkuri O, Leppaluoto J. (1988). Seasonal, menstrual and circadian secretions of melatonin, gonadotropins and prolactin in women. *Acta Physiol Scand.* 132: 321-327.

109. Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Begay V, Falcon J, Cahill GM, Cassone VM, Baler R. (1997). The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res.* 52: 307-357.
110. Klein DC, Moore RY. (1979). Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 174: 245-262.
111. Koçak A, Çolak A. (1996). Melatonin ve santral sinir sistemi. *J Turgut Özal Medical Center.* 3: 237-244.
112. Konakchieva R, Kyurkchiev S, Kehayov I, Taushanova P, Kanchev L. (1995). Selective effect of methoxyindoles on the lymphocyte proliferation and melatonin binding to activated human lymphoid cells. *J Neuroimmunol.* 63: 125-132.
113. Konakchieva R, Mitev Y, Almeida OF, Patchev VK. (1998). Chronic melatonin treatment counteracts glucocorticoid-induced dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Neuroendocrinology.* 67:171-180.
114. Krammer PN, Kirchner H, Schimpl A. (1989). Lymphokines. *Immunology Today.* 10: 521-522.
115. Krauss S, Buttgereit F, Brand MD. (1999). Effects of the mitogen concanavalin A on pathways of thymocyte energy metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1412:129-138.
116. Kuhlwein E, Irwin M. (2001). Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. *J Neuroimmunol.* 117: 51-57.
117. Kus I, Sarsilmaz M, Ogeturk M, Yilmaz B, Kelestimur H, Oner H. (2000). Ultrastructural interrelationship between the pineal gland and the testis in the male rat. *Arch Androl.* 45: 119-124.
118. Lappin MB, Campbell JD. (2000). The Th1-Th2 classification of cellular immune responses: concepts, current thinking and applications in haematological malignancy. *Blood Rev.* 14: 228-239.
119. Lee KY, Seong BL, Kim K. (2002). Soluble factor-mediated differentiation of CD4+CD8+ thymocytes to single positives in vitro. *Differentiation.* 70:410-421.
120. Lerner AB, (1978). Hormones in the pineal other than melatonin. Chairman's introduction ", *J Neural Transm Suppl.* 13:131-133.
121. Lerner AB, Case JD, Heinzelmann RV. (1959). Structure of melatonin, *J Am Chem Soc.* 81: 6084-6085.
122. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori N. (1958). Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes, *J Am Chem Soc.* 80: 2587.
123. Lewinski A, Zelazowski P, Sewerynek E, Zerek-Melen G, Szkudlinski M, Zelazowska E. (1989). Melatonin-induced suppression of human lymphocyte natural killer activity in vitro. *J Pineal Res.* 7:153-164.

- 124.Liebmann PM, Wolfler A, Felsner P, Hofer D, and Schauenstein K (1997) Melatonin and the immune system. *Int Arch Allergy Immunol* 112: 203-211.
- 125.Lissoni P, Barni S, Rovelli F, Brivio F, Ardizzioia A, Tancini G, Conti A, Maestroni GJ. (1993). Neuroimmunotherapy of advanced solid neoplasms with single evening subcutaneous injection of low-dose interleukin-2 and melatonin: preliminary results. *Eur J Cancer*. 29: 185-189.
- 126.Lissoni P, Meregalli S, Nosetto L, Barni S, Tancini G, Fossati V, Maestroni G. (1996). Increased survival time in brain glioblastomas by a radioneuroendocrine strategy with radiotherapy plus melatonin compared to radiotherapy alone. *Oncology*. 53: 43-46.
- 127.Lissoni P, Pittalis S, Rovelli F, Zecchini S, Casati M, Tremolada M, Pelizzoni F. (1996). Immunomodulatory properties of a pineal indole hormone other than melatonin, the 5-methoxytryptophol. *J Biol Regul Homeost Agents*. 10:27-30.
- 128.Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Brivio O, Fumagalli L. (1998). Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. *Nat Immun*. 16: 1-5.
- 129.Lissoni P, Tisi E, Barni S, Ardizzioia A, Rovelli F, Rescaldani R, Ballabio D, Benenti C, Angeli M, Tancini G, et al. (1992). Biological and clinical results of a neuroimmunotherapy with interleukin-2 and the pineal hormone melatonin as a first line treatment in advanced non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 66: 155-158.
- 130.Liu F, Ng TB, Fung MC. (2001). Pineal indoles stimulate the gene expression of immunomodulating cytokines ", *J Neural Transm*, 108:397-405.
- 131.Liu ZM, Pang SF. (1992). Binding of [¹²⁵I]-labelled iodomelatonin in the duck thymus. *Biol Signals*. 1: 250-256.
- 132.Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Segura JJ, Guerrero JM. (1993). Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. *Biotechnol Ther*. 4: 253-262.
133. Lopez-Gonzalez MA, Martin-Cacao A, Calvo JR, Reiter RJ, Osuna C. and Guerrero JM. (1993). Specific binding of [¹²⁵I]melatonin by partially purified membranes of rat thymus. *J. Neuroimmunol*. 45: 121-126.
- 134.Macchi MM, Bruce JN. (2004). Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*. 25: 177-195.
- 135.Maestroni GJ, Conti A. (1993). Melatonin in relation to the immune system. In: Yu HS, Reiter RJ (Eds.), *Melatonin. Biosynthesis, physiological effects and clinical applications*. CRC Pres, Boca Raton, FL. 290-306.
- 136.Maestroni GJ, Covacci V, Conti A. (1994). Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice. *Cancer Res*. 54: 2429-2432.
- 137.Maestroni GJ. (1993). The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res*. 14: 1-10.
- 138.Maestroni GJ. (1995). T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res*. 18: 84-89.

139. Maestroni GJ. (1998). The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. *J Photochem Photobiol B*. 43: 186-192.
140. Maestroni GJ. (2001). The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drug*. 10:467-476.
141. Marktl W, Brugger P, Herold M. (1997). Melatonin and coronary heart disease *Wien Klin Wochenschr*. 109: 747-749.
142. Mastronardi CA, Walczewska A, Yu WH, Karanth S, Parlow AF, McCann SM. (2000). The possible role of prolactin in the circadian rhythm of leptin secretion in male rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 224: 152-158.
143. McCord CP, Allen FP. (1917). Evidences associating pineal gland functions with alterations in pigmentation. *J Exp Zool*. 23: 207-224.
144. McKenzie AN, Culpepper JA, Malefyt RD, Briere F, Punnonen J, Aversa G, Sato A, Dang W, Cocks BG, Menon S, Vries JED, Banchereau J, Zurawski G. (1993). Interleukin 13, a T cell driven cytokine that regulates human monocyte and B cell function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 3735-3739.
145. Meguid MM, Fetisov SO, Varma M, Sato T, Zhang L, Laviano A, Rossi-Fanelli F. (2000). Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition*. 16: 843-857.
146. Miyao Y, Yasue H, Ogawa H, Misumi I, Masuda T, Sakamoto T, Morita E. (1993). Elevated plasma interleukin-6 levels in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 126: 1299-1304.
147. Molinero P, Soutto M, Benot S, Hmadcha A, Guerrero JM. (2000). Melatonin is responsible for the nocturnal increase observed in serum and thymus of thymosin alpha1 and thymulin concentrations: observations in rats and humans. *J Neuroimmunol*. 103: 180-188.
148. Moller G. (1988). The T cell repertoire. *Immunol Rev*. 101:1-215.
149. Moller M. (1992). Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech*. 21: 188-204.
150. Montilla P, Tunez I, Munoz MC, Soria JV, Lopez A. (1997). Antioxidative effect of melatonin in rat brain oxidative stress induced by Adriamycin. *Rev Esp Fisiol*. 53: 301-305.
151. Montilla PL, Vargas JF, Tunez IF, Munoz de Agueda MC, Valdelvira ME, Cabrera ES. (1998). Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. *J Pineal Res*. 25: 94-100.
152. Moore RY, Lenn NJ (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol*. 146: 1-14.
153. Moore RY. (1983). Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed Proc*. 42: 2783-2789.
154. Morin D, Simon N, Depres-Brummer P, Levi F, Tillement JP, Urien S. (1997). Melatonin high-affinity binding to alpha-1-acid glycoprotein in human serum. *Pharmacology*. 54: 271-275.

155. Morrey KM, McLachlan JA, Serkin CD, Bakouche O (1994). Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol.* 153:2671-2680.
156. Moskowitz MA, Wurtman RJ. (1982). New approaches to the study of the pineal organ. In: Bloodworth JMB ed(s). *Endocrine pathology general and surgical*, London, Williams Wilkins: 133-154.
157. Mosmann TR, Sad S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 17: 138-146.
158. Muller JE, Ludmer PL, Willich SN, Tofler GH, Aylmer G, Klangos I, Stone PH. (1987). Circadian variation in the frequency of sudden cardiac death. *Circulation.* 75: 131-138.
159. Muller JE. (1999). Circadian variation and triggering of acute coronary events. *Am Heart J.* 137: S1-8.
160. Mustonen AM, Nieminen P, Hyvarinen H, Asikainen J. (2000). Exogenous melatonin elevates the plasma leptin and thyroxine concentrations of the mink (*Mustela vison*). *Z Naturforsch [C]*. 55: 806-813.
161. Mustonen AM, Nieminen P, Hyvarinen H. (2001). Preliminary evidence that pharmacologic melatonin treatment decreases rat ghrelin levels. *Endocrine.* 16: 43-46.
162. Mustonen AM, Nieminen P, Hyvarinen H. (2002). Melatonin and the wintering strategy of the tundra vole, *Microtus oeconomus*. *Zoolog Sci.* 19: 683-687.
163. Niedziela M, Lerchl A, Nieschlag E. (1995). Direct effects of the pineal hormone melatonin on testosterone synthesis of Leydig cells in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*) in vitro. *Neurosci Lett.* 201: 247-250.
164. Nir I. (1995). Biorhythms and the biological clock involvement of melatonin and the pineal gland in life and disease. *Biomed Environ Sci.* 8: 90-105.
165. Nishimura T, Ohta A. (1999). A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice. *J Immunol.* 162: 6503-6509.
166. Noronha IL, Niemir Z, Stein H, Waldherr R. (1995). Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 10: 775-786.
167. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrang P, Canet E, Boutin JA. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem.* 275: 31311-31317.
168. Nossal GJ. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell.* 76: 229-39.
169. Nunnari G, Nigro L, Palermo F, Leto D, Pomerantz RJ, Cacopardo B. (2003). Reduction of serum melatonin levels in HIV-1-infected individuals' parallel disease progression: correlation with serum interleukin-12 levels. *Infection.* 31: 379-382.
170. Oner H, Kus I, Oner J, Ogeturk M, Ozan E, Ayar A. (2004). Possible effects of melatonin on thymus gland after pinealectomy in rats. *Neuro Endocrinol Lett.* 25:115-118.
171. Oppenheim JJ, Neta R. (1994). Pathophysiological roles of cytokines in development, immunity, and inflammation. *FASEB J.* 8: 158-162.

172. Orlando JR, Heberman RB. (1984). Heterogeneity of naturel killer cells. *Annu Rev Immunol.* 2: 359-377.
173. Ölmez E, Şahna E, Ağkadir M, Acet A. (2000). Melatonin: Emeklilik yaşı 80 olur mu? *T Özal Tıp Merkezi Dergisi.* 7: 177-187.
174. Özbal Y. (1999). Lenfosit. *Erciyes Üniversitesi Yayınları*, No: 117, Kayseri.
175. Pahkla R, Zilmer M, Kullisaar T, Rago L. (1998). Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline in vitro. *J Pineal Res.* 24: 96-101.
176. Pang CS, Pang SF. (1992). High affinity specific binding of 2-[125I] iodomelatonin by spleen membrane preparations of chicken. *J Pineal Res.* 12: 167-173.
177. Pang SF, Tang F, Tang PL. (1984). Negative correlation of age and the levels of pineal melatonin, pineal N-acetylserotonin, and serum melatonin in male rats. *J Exp Zool.* 229: 41-47.
178. Pang SF, Yu HS, Suen HC, Brown GM. (1980). Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm. *J Endocrinol.* 87: 89-93.
179. Peleman R, Wu J, Fargeas C, Delespesse G. (1989). Recombinant interleukin 4 suppresses the production of interferon-gamma by human mononuclear cells. *J Exp Med.* 170: 1751-1756.
180. Pellicer A, Albert C, Mercader A, Bonilla-Musoles F, Remohi J, Simon C. (1998). The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. *Fertil Steril.* 70: 425-431.
181. Persengiev SP, Kyurkchiev S. (1993). Selective effect of melatonin on the proliferation of lymphoid cells. *Int J Biochem.* 25:441-444.
182. Persengiev SP. (1992). 2-(125I) iodomelatonin binding sites in rat adrenals: pharmacological characteristics and subcellular distribution. *Life Sci.* 51: 647-651.
183. Petrovsky N, Harrison LC. (1997) Diurnal rhythmicity of human cytokine production: a dynamic disequilibrium in T helper cell type 1/T helper cell type 2 balance? *J Immunol.* 158:5163-5168.
184. Pevet P, Ebels I, Swaab DF, Mud MT, Arimura A. (1980). Presence of AVT-, alpha-MSH-, LHRH- and somatostatin-like compounds in the rat pineal gland and their relationship with the UMO5R pineal fraction. An immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 206: 341-353.
185. Pevet P. (1982). Pineal peptides in the fetus and in young and adult mammals. pp. 155-181. Ed. DC Klein. *Melatonin rhythm generating system.* Karger, Basel.
186. Pierrefiche G, Topall G, Courboin G, Henriet I, Laborit H. (1993). Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 80: 211-223.
187. Pietrobon D, Hess P. (1990). Novel mechanism of voltage-dependent gating in L-type calcium channels. *Nature.* 346: 651-655.
188. Pinillos ML, De Pedro N, Alonso-Gomez AL, Alonso-Bedate M, Delgado MJ. (2001). Food intake inhibition by melatonin in goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol Behav.* 72: 629-634.

189. Pisa P, Gennene M, Soder O, Ottenhoff T, Hansson M, Kiessling R. (1990). Serum tumor necrosis factor levels and disease dissemination in leprosy and leishmaniasis. *J Infect Dis.* 161: 988-991.
190. Popesko P, Rajtova V, Horak J. (1992). A colour atlas of anatomy of small laboratory animals (2). Volume two: Rat-mouse-golden hamster. London. Sayfa: 17-47.
191. Provinciali M, Di Stefano G, Bulian D, Tibaldi A, and Fabris N (1996) Effect of melatonin and pineal grafting on thymocyte apoptosis in aging mice. *Mech Ageing Dev* 90: 1-19.
192. Quay WB. (1963). Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modification of estrous cycle and photoperiod. *Gen Comp Endocrinol.* 3: 1473–1479.
193. Quay WB. (1964). Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5 hydroindole-3-indole acetic acid. *Proc Soc Exp Biol Med.* 115: 710–714.
194. Raghavendra V, Kulkarni SK. (2000). Melatonin reversal of DOI-induced hypophagia in rats; possible mechanism by suppressing 5-HT(2A) receptor-mediated activation of HPA axis. *Brain Res.* 860: 112-118.
195. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. (2000). Melatonin and its relation to the immune system and inflammation . *Ann N Y Acad Sci.* 917: 376-386.
196. Reiter RJ, Craft CM, Johnson JE Jr, King TS, Richardson BA, Vaughan GM, Vaughan MK. (1981). Age-associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats. *Endocrinology.* 109: 1295-1297.
197. Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. (1998). Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Ann N Y Acad Sci.* 854: 410-424.
198. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci.* 7: 444-458.
199. Reiter RJ. (1981). The mammalian pineal gland: Structure and function. *Am J Anat.* 162: 287-313.
200. Reiter RJ. (1987). The melatonin message: duration versus coincidence hypotheses. *Life Sci.* 40: 2119-2131.
201. Reiter RJ. (1991). Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol.* 79: 153-158.
202. Reiter RJ. (1992). The ageing pineal gland and its physiological consequences. *Bioessays.* 14: 169-175.
203. Reiter RJ. (1993). Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Braz J Med Biol Res.* 26: 1141-1155.
204. Reppert SM, Chez RA, Anderson A, Klein DC. (1979). Maternal-fetal transfer of melatonin in the non-human primate. *Pediatr Res.* 13: 788-791.
205. Reppert SM, Klein DC. (1978). Transport of maternal [3H]melatonin to suckling rats and the fate of [3H]melatonin in the neonatal rat. *Endocrinology.* 102: 582-588.

206. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*. 13: 1177-1185.
207. Reppert SM, Weaver DR, Godson C. (1996). Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci*. 17: 100-102.
208. Ressmeyer AR, Mayo JC, Zelosko V, Sainz RM, Tan DX, Poeggeler B, Antolin I, Zsizsik BK, Reiter RJ, Hardeland R. (2003). Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep*. 8: 205-213.
209. Ribelayga C, Gauer F, Pevet P, Simonneaux V. (1998). Distribution of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA in the rat brain: an in situ hybridisation study. *Cell Tissue Res*. 291: 415-421.
210. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*. 36: 1-9.
211. Roilides E, Sein T, Schaufele R, Chanock SJ, Walsh TJ. (1998). Increased serum concentrations of interleukin-10 in patients with hepatosplenic candidiasis. *J Infect Dis*. 178: 589-592.
212. Romagnani S. (1995). Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol*. 15: 121-129.
213. Ronco AL, Halberg F. (1996). The pineal gland and cancer. *Anticancer Res*. 16: 2033-2039.
214. Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. (1995). *Histology. A text and atlas*. 3 rd., Williams&Wilkins, Baltimore.
215. Rudick RA, Ransohoff RM. (1992). Cytokine secretion by multiple sclerosis monocytes. Relationship to disease activity. *Arch Neurol*. 49: 265-270.
216. Sabuncuoğlu BT. (1992). Erişkin insan, köpek, tavşan ve sıçan pineal organlarının ışık mikroskopu düzeyinde kıyaslı incelenmesi. Uzmanlık Tezi, Ankara.
217. Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H. (1999). Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 41:297-306.
218. Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. (1993). Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 10188-10192.
219. Sekimoto M, Tsuji T, Matsuzaki J, Chamoto K, Koda T, Nemoto K, Degawa M, Nishimura S, Nishimura T. (2003). Functional expression of the TrkC gene, encoding a high affinity receptor for NT-3, in antigen-specific T helper type 2 (Th2) cells. *Immunol Lett*. 88: 221-226.
220. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, Ortiz GG, Lewinski A. (1996). Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatogastroenterology*. 43: 898-905.

221. Shaji AV, Kulkarni SK, Agrewala JN. (1998). Regulation of secretion of IL-4 and IgG1 isotype by melatonin-stimulated ovalbumin-specific T cells. *Clin Exp Immunol.* 111: 181-185.
222. Shearer WT, Lee BN, Cron SG, Rosenblatt HM, Smith EO, Lugg DJ, Nickolls PM, Sharp RM, Rollings K, Reuben JM. (2002). Suppression of human anti-inflammatory plasma cytokines IL-10 and IL-1RA with elevation of proinflammatory cytokine IFN-gamma during the isolation of the Antarctic winter. *J Allergy Clin Immunol.* 109: 854-857.
223. Silva SO, Ximenes VF, Catalani LH, Campa A. (2000). Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 279: 657-662.
224. Simonneaux V, Ribelayga C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev.* 55: 325-395.
225. Sitman EL. (1984). Melatonin and photoperiodic time measurement: Evidence from rodents and ruminants. Ed. Reiter RJ. *The pineal gland.* Raven Press, New York. 155-192.
226. Smith JA, Mee TJ, Padwick DJ, Spokes EG. (1981). Human post-mortem pineal enzyme activity. *Clin Endocrinol.* 14: 75-81.
227. Smith KA (1988). Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science.* 240: 1169-1176.
228. Snyder SH, Axelrod J. (1964). Influence of light and sympathetic system on 5-hydroxytryptophan decarboxylase activity in the pineal gland. *Fed Proc.* 23: 206-211.
229. Sugden D, Chong NW. (1991). Pharmacological identity of 2-[125I] iodomelatonin binding sites in chicken brain and sheep pars tuberalis. *Brain Res.* 539: 151-154.
230. Sugden D. (1979). Circadian change in rat pineal tryptophan content: lack of correlation with serum tryptophan. *J Neurochem.* 33: 811-813.
231. Swanson LW, Sawchenko PE. (1983). Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci.* 6: 269-324.
232. Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature.* 380: 627-630.
233. Tamarkin L, Cohen M, Roselle D, Reichert C, Lippman M, Chabner B. (1981). Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. *Cancer Res.* 41: 4432-4436.
234. Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R, Reiter RJ. (2001). N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J.* 15: 2294-2296.
235. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Kim SJ, El-Sokkary GH. (1998). Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: prevention by melatonin. *J Pineal Res.* 25: 184-191.

236. Tapp E, Huxley M. (1972). The histological appearance of the human pineal gland from puberty to old age. *J Pathol.* 108: 137-144.
237. Thayer SA, Perney TM, Miller RJ. (1988). Regulation of calcium homeostasis in sensory neurons by bradykinin. *J Neurosci.* (11): 4089-4097.
238. Tortolani PJ, Lal BK, Riva A, Johnston JA, Chen YQ, Reaman GH, Beckwith M, Longo D, Ortaldo JR, Bhatia K, McGrath I, Kehrl J, Tuscano J, McVicar DW, O'Shea JJ. (1995). Regulation of JAK3 expression and activation in human B cells and B cell malignancies. *J Immunol.* 155: 5220-5226.
239. Tranchot-Diallo J, Gras G, Parnet-Mathieu F, Benveniste O, Marce D, Roques P, Milliez J, Chaouat G, Dormont D. (1997). Modulations of cytokine expression in pregnant women. *Am J Reprod Immunol.* 37: 215-226.
240. Uddhammar A, Sundqvist KG, Ellis B, Rantapaa-Dahlqvist S. (1998). Cytokines and adhesion molecules in patients with polymyalgia rheumatica. *Br J Rheumatol.* 37: 766-769.
241. Vacas MI, Del Zar MM, Martinuzzo M, Cardinali DP. (1992). Binding sites for [3H]-melatonin in human platelets. *J Pineal Res.* 13: 60-65.
242. Valero N, Bonilla E, Pons H, Chacin-Bonilla L, Anez F, Espina LM, Medina-Leendertz S, Garcia Tamayo J. (2002). Melatonin induces changes to serum cytokines in mice infected with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 96:348-351.
243. Vanecek J, Pavlik A, Illnerova H. (1987). Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res.* 435: 359-362.
244. Vanecek J, Vollrath L. (1990). Daily changes in melatonin binding sites and the effect of castration. *Mol Cell Endocrinol.* 73: 165-170.
245. Vanecek J. (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 78: 687-721.
246. Von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. (2002). Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 309: 151-162.
247. Waage A, Halstensen A, Espevik T. (1987). Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet.* 1: 355-357.
248. Waldhauser F, Dietzel M. (1985). Daily and annual rhythms in human melatonin secretion: role in puberty control. *Ann N Y Acad Sci.* 453: 205-214.
249. Waldhauser F, Ehrhart B, Forster E. (1993). Clinical aspects of the melatonin action: impact of development, aging and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions. *Experientia.* 49: 671-681.
250. Waldhauser F, Lynch H, Wurtman R. (1984). Melatonin in human body fluids: Clinical significance. Ed. Reiter RJ. *The pineal gland.* Raven Press, New York. 345-370.
251. Wilson JD, Foster DW. (1985). The pineal gland and circum ventricular organs. In: *Textbook of endocrinology*, 7th ed. WB Saunders co: Philadelphia. 535-563.

252. Withyachumnarnkul B, Reiter RJ, Lerchl A, Nonaka KO, Stokkan KA. (1991). Evidence that interferon-gamma alters pineal metabolism both indirectly via sympathetic nerves and directly on the pinealocytes. *Int J Biochem.* 23:1397-1401.
253. Wozniak DF, Stewart GR, Miller JP, Olney JW. (1991). Age-related sensitivity to kainate neurotoxicity. *Exp Neurol.* 114: 250-253.
254. Wurtman RJ, Axelrod J, Chu EW. (1963). Melatonin, a pineal substance: effect on the rat ovary. *Science.* 141: 277-278.
255. Wurtman RJ, Zhdanova I. (1995). Improvement of sleep quality by melatonin. *Lancet.* 346: 1491.
256. Yazıcı C, Köse K. (2004). Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü. *Erciyes Üniv Sağlık Bil Dergisi (E. Ü. Journal of Health Sciences).* 13: 56-65.
257. Yilmaz B, Kutlu S, Mogulkoc R, Canpolat S, Sandal S, Tarakci B, Kelestimur H. (2000). Melatonin inhibits testosterone secretion by acting at hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the rat. *Neuro Endocrinol Lett.* 21: 301-306.
258. Zhai Y, Ghobrial RM, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. (1999). Th1 and Th2 cytokines in organ transplantation: paradigm lost? *Crit Rev Immunol.* 19: 155-172.
259. Zrenner C. (1985). Theories of pineal function from classical antiquity to 1900: A history In: Reiter RJ, Editors, *Pineal Research Reviews III*, Alan R. Liss, New York. 1–40.
260. Zylinska K, Komorowski J, Robak T, Mucha S, Stepień H. (1995). Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor on melatonin secretion in rats in vivo and in vitro studies. *J Neuroimmunol.* 56:187-190.

8. ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Samsun’da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi aynı şehirde tamamladıktan sonra, 1997 yılında kazandığım Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 2003 yılında Veteriner Hekim olarak mezun oldum. Aynı yıl, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nün açmış olduğu lisansüstü eğitim sınavını kazanarak, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başladım. Ayrıca, 2005 yılı Ekim ayından itibaren, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi’nde (FÜTDAM) görev yapmaktayım.