

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TÜBERKÜLOZLU HASTALARDA YÜKSEK PERFORMANSLI
SIVI KROMATOGRAFİ (HPLC) YÖNTEMİ İLE PLAZMA
MELATONİN DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Esin ÖZKAN**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nevin İLHAN**

**ELAZIĞ
2009**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr.

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

.....

..... **Anabilim Dalı Başkanı**

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

.....

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

..... _____

..... _____

..... _____

..... _____

..... _____

*Çok Değerli Anneme, Babama
Sevgili Eşime...*

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında gerekli her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Nevin İLHAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitimim süresince yardım ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Necip İLHAN'a ve değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. M. Ferit GÜRSU'ya, Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ'a, Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU'na, Doç. Dr. Nermin KILIÇ'a, Yrd. Doç. Dr. Süleyman AYDIN'a ve Yrd. Doç. Dr. Dilara KAMAN'a teşekkür ederim.

GATA Tıbbi Biyokimya AD'da geçirdiğim süre içerisinde eğitimim ve tez çalışmalarım için her türlü desteklerini ve emeğini esirgemeyen Prof. Dr. M. Kemal ERBİL, Doç. Dr. Halil YAMAN'a ve Doç. Dr. E. Özgür AKGÜL'e ve diğer hocalarım Prof. Dr. Şerif AKMAN'a, Prof. Dr. Cumhuriyet BİLGİ'ye, Prof. Dr. İsmail KURT'a, Doç. Dr. Taner ÖZGÜRTAŞ'a, Doç. Dr. Muhittin A. SERDAR'a, Doç. Dr. Erdiç ÇAKIR'a, Yrd. Doç. Dr. Adnan HAŞİMİ'ye, Yrd. Doç. Dr. Serkan TAPAN'a, Yrd. Doç. Dr. Tuncer ÇAYCI'ya teşekkür ederim. Tez çalışmam sırasında desteklerini esirgemeyen Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz AD'dan Doç. Dr. Ömer DENİZ'e ve yoğun mesaisi içerisinde vakaların seçilmesi ve örneklerin toplanmasında gösterdiği özveri için Araş. Görv. Dr. Yakup Arslan'a ayrıca teşekkür ederim. İstatistiksel analizlerin yapılmasında yardımını esirgemeyen GATA Halk Sağlığı AD'dan Doç. Dr. Selim KILIÇ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yakın destek ve dostluklarını gördüğüm Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD ve GATA Tıbbi Biyokimya AD'daki tüm asistan arkadaşlarıma ve görevli tüm personele teşekkür ederim.

Varlıklarıyla her zaman yanımda hissettiğim, bugüne kadar her konuda beni destekleyen başta annem, babam ve eşim olmak üzere tüm aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışmasını 1561 no'lu proje ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelendirme (FÜBAP) fonuna teşekkür ederim.

ÖZET

Son yıllarda yaygınlığı artmakta olan tüberküloz büyük bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Tanı ve tedavisinde önemli mesafeler alınmış olsa da, immuno-endokrin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Melatoninin immunomodülatör etkileri yaklaşık 30 yıldır bilinmekle birlikte tüberkülozdaki etkisi ortaya konulmamıştır. Bu çalışmada, tüberküloz ile melatonin arasındaki ilişkiyi ortaya koymak ve plazma melatonin düzeylerini yeni bir HPLC metodu ile ölçmek amaçlanmıştır.

Çalışmaya ARB (+), kültür (+) olan ilk kez tüberküloz tanısı almış 31 hasta ile enfeksiyonu ve sistemik hastalığı olmayan 31 sağlıklı kişi kontrol olarak dahil edilmiştir. Çalışmaya katılanların hepsi erkek ve yaş ortalamaları hasta grubunda 22,9±3,8 ve kontrol grubunda 23,6±3,4 yıl idi.

Numunelerden melatonin ekstraksiyonu için Waters Oasis HLB SPE kolonları kullanıldı. Plazma melatonin düzeyleri, floresans dedektörlü AGILENT 1100 ile 75 mM sodyum asetat/asetonitril (72/28, v/v) (pH: 5) mobil fazı kullanılarak, eksitasyon ve emisyon dalga boyları 275 ve 345 nm'de ölçüldü. 40 µL'lik enjeksiyon ile 10 dk'lık bir çalışma süresinde analiz yapıldı. Çalışma sonuçları eksternal standarda göre hesaplandı. Saptanabilir en düşük konsantrasyon 0,25 pg/mL olup çalışma 1000 pg/mL'ye kadar lineerdi. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlikleri sırasıyla % 4.02 ve 5.41 olarak bulundu. İdrar melatonin sülfat düzeyleri ise ELISA metodu ile ölçüldü.

Plazma melatonin düzeyleri (pg/mL) hasta grubunda 33,17 (7,52-163,41) iken, kontrol grubunda 45,20 (19,27-288,99) tespit edildi (p=0,037). İdrar melatonin sülfat seviyeleri (µg/24 saat) ise hasta grubunda 6,5 (0,2-34,8) iken, kontrol grubunda 21,7 (3,9-99,8) olarak bulundu (p<0,001).

Bu sonuçlar tüberküloz ile düşük melatonin seviyesi arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Ancak bu konuda yapılacak yeni çalışmalar ile melatoninin etki mekanizması, enfeksiyondan koruyuculuğu ve tedavideki etkinliğinin ortaya konulması, tüberküloz tedavisinde yeni ufuklar açılmasını sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Tüberküloz, immünite, melatonin, melatonin sülfat, HPLC.

ABSTRACT

**PLASMA MELATONIN LEVEL DETECTION WITH A HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHOD IN
TUBERCULOSIS PATIENTS**

Tuberculosis continues to constitute an important health problem in recent years along with the increase in its spread. Though important improvements were gained in diagnosis and treatment, immuno-endocrine mechanism could not have been enlightened yet. Immunomodulator effect of melatonin is known for nearly 30 years, still, its possible effects on TB was not introduced. This study aims to expose the relationship between TB and melatonin, along with development of HPLC method for melatonin in human plasma.

31 patients diagnosed for the first time for TB, and positive for both ARB and culture; and 31 healthy controls with no systemic disease were involved in the study. All participants were males, and mean ages were $22,9 \pm 3,8$ years in patients group and $23,6 \pm 3,4$ in control.

For SPE method, a Waters Oasis HLB extraction column was used in a fluorescent detector equipped Agilent 1100 HPLC system with isocratic 75 mM sodium acetate/acetonitrile (72/28, v/v) (pH: 5) mobile phase setup. Melatonin displays excitation and emission spectra with wavelength maxima at 275 nm and 345 nm, respectively. 40 μ L injection volume was followed by 10 min run. Limit of detection (LOD), with external standard calibration method, was 0,25 pg/mL within a linearity up to 1000 pg/mL. Inter and intraassay coefficients of variation (CV) were 4,02% and 5,41%, respectively. Urine melatonin sulphate levels were analyzed with a commercial kit using ELISA method.

Mean plasma melatonin levels (pg/mL) in patient group were detected as 33,17 (7,52-163,41), and 45,20 (19,27-288,99) in control ($p=0,037$). Mean urine melatonin sulphate levels (μ g/24 h) were 6,5 (0,2-34,8) in patient groups, and 21,7 (3,9-99,8) in control ($p<0,001$).

These results suggest a relation between TB and low level melatonin in serum. Anyway, further studies may elucidate melatonin's mechanism for effect, protection against infection and its activity in treatment, laying new frontiers in treatment of TB.

Key Words: Tuberculosis, immunity, melatonin, melatonin sulphate, HPLC.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Tüberküloz	2
1.1.1 Bulaşma ve Semptomlar	2
1.1.2. Tüberkülozda Tanı Yöntemleri	3
1.1.3. İmmün Sistem ve TB	7
1.2. Melatonin	9
1.2.1. Genel Bilgiler	9
1.2.2. Melatoninin Etkileri	18
1.2.2.1. İmmün Sistem Üzerine Melatoninin Etkisi	18
1.2.2.2. Antioksidan Olarak Melatonin	20
1.2.2.3. Melatoninin Karsinogenez Üzerine Etkisi	22
1.2.2.4. Yaşlanma ve Melatonin	24
1.2.2.5. İskelet Sistemi ve Melatonin	25
1.2.2.6. Kardiyovasküler Sistem ve Melatonin	26
1.2.2.7. Melatoninin Diğer Etkileri	26
1.2.2.8. Melatonin ve Melatonin Sülfat Ölçümünde Kullanılan Analitik Yöntemler	27

1.2.2.8. 1. Melatonin Ölçüm Yöntemleri	27
1.2.2.8.1.1. Radyoimmünassay (RIA)	27
1.2.2.8.1.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	28
1.2.2.8.1.3. Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrofotometrisi (GC-MS)	28
1.2.2.8.1.4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	28
1.2.2.8. 2. Melatonin Sülfat Ölçüm Yöntemleri	29
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Çalışma Grubu	30
2.2. Örneklerin Toplanması ve Yapılan Ölçümler	30
2.2.1. Kan Örneklerinin Toplanması	30
2.2.2. İdrar Örneklerinin Toplanması	30
2.3. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler	31
2.4. Yöntemler	33
2.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması	33
2.4.1.1. Mobil Faz (75 mM sodyum asetat / asetonitril (72:28, v/v) (pH: 5).	33
2.4.1.2. Melatonin Standartı	34
2.4.1.3. İnternal Standart	34
2.4.2. Örneklerin Hazırlanması	34
2.4.2.1. Solid Faz Ekstraksiyon Kolonlarının Hazırlanması	34
2.4.2.2. Plazma Melatonin Ölçümü İçin Örnek Hazırlanması	35
2.5. Analiz	35
2.5.1. HPLC Sisteminin Özellikleri:	35
2.5.2. Melatonin Eksternal Standart Çözeltisi İle Kalibrasyon	35
2.5.3. Yöntem Validasyonu	40
2.5.3.1. Melatonin Ölçümü İçin Gün İçi (Intra-assay) Tekrarlanabilirlik	40

2.5.3.2. Melatonin Ölçümü İçin Günler Arası (Inter-assay) Tekrarlanabilirlik	40
2.5.3.3. Melatonin Ölçümü İçin Geri Elde (Recovery)	41
2.5.3.4. Linearite	41
2.5.4. İdrar Melatonin Sülfat Düzeylerinin Ölçümü	42
2.5.6. Diğer Laboratuvar Parametrelerinin Ölçümü	43
2.5.7. İstatistiksel Analiz	43
3.BULGULAR	44
3.1. Plazma Melatonin Düzeyleri	44
3.2. İdrar Melatonin Sülfat Düzeyleri	44
3.3. Diğer Laboratuvar Parametrelerinin Düzeyleri	45
3.4. Değişkenler Arası Doğrusal İlişki (korelasyon) Varlığının Değerlendirilmesi	47
4.TARTIŞMA	48
5. KAYNAKLAR	54
6. ÖZGEÇMİŞ	67

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Melatonin ölçümü için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları	40
Tablo 2. Hasta ve kontrol gruplarına ait laboratuvar sonuçları	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Pineal bezin anatomik lokalizasyonu	10
Şekil 2. Melatoninin moleküler yapısı	10
Şekil 3. Melatonin biyosentezi	11
Şekil 4. Melatonin reseptörleri	12
Şekil 5. Melatonin seviyesindeki diurnal değişiklikler	13
Şekil 6. Melatonin düzeylerindeki yaşlara göre değişiklikler	14
Şekil 7. Işık ve karanlık döngüsünün pineal glanddan melatonin salınımı üzerine etkisi	15
Şekil 8. Triptofan metabolizmasının alternatif yolu	17
Şekil 9. Pinealositlerde L-triptofandan melatonin oluşumu ve karaciğerde metabolizması	18
Şekil 10. Melatoninin immün sisteme etkisi	19
Şekil 11. HPLC cihazı AGILENT ve ekipmanları	32
Şekil12. SPE kolonlarının hazırlanması	34
Şekil 13. Melatonin standart eğrisi	36
Şekil 14. 12,5; 25; 50; 100; 200 pg/mL konsantrasyonlara sahip Melatonin Standartlarına ait kromatogramların üst üste konularak elde edildiği grafik	37
Şekil 15. A:12,5 B:25 C:50 D:100 E:200 pg/mL melatoninin standartlarına ait kromatogramlar	38
Şekil 16. Sağlıklı bir bireye ait plazma melatonin kromatogramı	39
Şekil 17. Tüberkülozlu bir bireye ait plazma melatonin kromatogramı	39
Şekil 18. 0,25; 0,5; 1; 10; 20; 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000 pg/mL konsantrasyonlarına sahip melatonin Standartları kullanılarak elde edilen linearite grafiği	42
Şekil 19. Melatonin Sülfat standartlarına ait regresyon analiz grafiği	43
Şekil 20. Hasta ve kontrol gruplarında plazma melatonin düzeyleri	44
Şekil 21. Hasta ve kontrol gruplarında idrar melatonin sülfat düzeyleri	45

KISALTMALAR LİSTESİ

AA-NAT	: Arylakylamine N-acetyltransferase
ADCC	: Antikor-bağımlı hücrel sitotoksisite
AMK	: N1-acetyl-5- methoxykynuramine
aMT6S	: Melatonin sülfat (6-sülfatoksimelatonin: 6-hidroksimelatonin sülfat)
APG/MLK	: Arylamine phormamidase ve N1-acetyl-N2-formyl-5 methoxykynuramine
APUD	: Amine precursor uptake deamin
ARB	: Aside dirençli basil
CAT	: Katalaz
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DHEASO₄	: Dehidroepiandrosteron sülfat
EDTA	: Etilen diamin tetraasetikasit
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
FLD	: Floresan dedektör
FOB	: Fiberoptik bronkoskopi
GABA	: Gama-amino-n-butirik asit
GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
GİS	: Gastrointestinal sistem
GM-CFU	: Granulocyte monocyte- colony forming unite
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSH	: Glutatyon
GC-MS	: Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrofotometrisi
H. Piloni	: Helikobakter pilori
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HIOMT	: Hidroksiindol O-metiltransferaz
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
ICER	: Induced cAMP gene transcription repressor
IL	: İnterlökin
INF-γ	: İnterferon gama
Lpr 1	: Lipoprotein alleli 1

MTB	: Mycobacterium tuberculosis
NAT	: N-Asetil transferaz
NE	: Norepinefrin
NK	: Natural killer
NO	: Nitrik oksid
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
ONOO⁻	: Peroksinitrit
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PPD	: Purified Protein Derivative (=Saflaştırılmış Protein Türevi)
RFLP	: Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi
RIA	: Radyo Immuno Assay
RT	: Pik çıkış zamanı (Retention time)
SCF	: Kök hücre faktörü
SCG	: Superior servikal ganglion
SCN	: Suprakiazmatik nukleus
SLC11A1	: Solute carrier family 11 member 1
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPE	: Solid faz ekstraksiyon
SS	: Standart Sapma
TB	: Tüberküloz
TGF-β	: Transforming growth faktör beta
Th1	: T-helper1
TLR2	: Toll-like receptor 2
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör-α
TU	: Tüberkülin Ünitesi
VKİ	: Vücut kitle indeksi
% CV	: Coefficient of variation (yüzde değişkenlik katsayısı)
·OH	: Hidroksil radikali
¹O₂	: Singlet oksijen

1.GİRİŞ

Her yıl 7,5 milyon yeni vakanın eklendiği (1) bu gün dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin enfekte olduğu (2) tüberküloz (TB) hastalığı özellikle üçüncü dünya ülkeleri olmak üzere büyük bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bu nedenle TB'un erken ve doğru tanısı hastalığın toplumda yayılımının kontrolünde ve tedavisinde büyük önem taşımaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar TB enfeksiyonunun kontrol altına alınmasında karmaşık bir immuno-endokrin cevabın rol oynadığını göstermektedir. Bu cevap içinde hipotalamo-pituiter-adrenal aksın ve T lenfositlerinin etkin olduğu gösterilmiştir (1). Ancak başka hangi sistemlerin bu mekanizmaya katıldığı tam olarak aydınlatılmış değildir.

Pineal bezden salınan bir nörohormon olan melatoninin (N-asetil -5 metoksi-triptamin) de immüniteyi artırıcı etkileri yaklaşık 30 yıldır bilinmektedir. Melatonin, triptofandan sentez edilir ve salınımı yaşa ve mevsime bağlı olarak değişkenlik gösterir. Sentezi ışık ve karanlık periyotlarından etkilenmekte ve maksimum salınım gece saat 02⁰⁰ 04⁰⁰ arasında ve karanlıkta olmaktadır. İmmün sistem üzerindeki etkilerinin yanısıra melatoninin antioksidan, antiapoptotik, antikanserojen, yaşlanmayı geciktirici özellikleri de vardır (3). İnsanda günlük oral melatonin alımı, natural killer (NK) hücre aktivitesini artırmakta, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), transforming growth faktör beta (TGF- β), interlökin (IL)1-beta, interferon gama (INF- γ) ve kök hücre faktörü (SCF) gibi immün düzenleyici sitokinlerin gen ekspresyonlarını düzenlemektedir (4, 5).

Melatonin, granülositlerin ve makrofajların kök hücrelerinin (GM-CFU) üretimini uyarır ve hematopoeziste genel bir uyarıcı etkiye sahiptir. Melatoninin monosit üretimi üzerine etkileri, melatonin reseptörleri üzerine direkt etkilerinden dolayı kısmi olabilir veya IL-3, IL-4, IL-6 veya GM koloni stimülan faktör (GM-CSF) gibi uyaranlara monosit duyarlılığındaki bir artıştan dolayı olabilir.

Fizyolojik olarak melatonin, T-helper 1 (Th1) hücreleri tarafından salınan sitokinlerle ilişkilidir ve melatonin verilmesi Th1 üretimini destekler (6).

Tüm bunlar TB'da da immün sistemin aktivasyonu ve enfeksiyona cevapta melatoninin etkinliğinin olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu güne kadar TB ve melatonin arasındaki etkileşimi ve bağlantıyı gösterir bir çalışmaya

literatürde rastlanmamıştır. Yaptığımız bu çalışma TB ile melatonin seviyesi arasındaki ilişkiyi göstermesi bakımından yapılmış ilk çalışmadır.

Bu çalışmada öncelikle melatonin ölçümünü optimize ederek HPLC laboratuvarının rutin ölçümleri arasına girmesini sağlamak amaçlanmıştır. İlk kez akciğer TB tanısı almış hastalarda ve kontrol grubu bireylerde plazma melatonin düzeylerinin ölçülmesi ve akciğer TB'unun etyopatogenezinde suçlanan immün sistem değişiklikleri ile immün cevap üzerinde etkisi olduğu bilinen plazma melatonin düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır.

1.1. Tüberküloz

TB dünya nüfusunun yaklaşık üçte birini etkileyen ve TB basili *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)'in neden olduğu büyük bir sağlık sorunudur. Her yıl 7,5 milyon insan hastalığa yakalanmaktadır ki bunlarında %95'i gelişmekte olan ülkelerdedir (1). TB bütün yaş gruplarında görülen ve tüm sistemleri tutabilen bir hastalıktır. Prevalansın yüksek olduğu toplumlarda kişi genellikle çocukluk yaşlarında TB basili ile karşılaşmıştır. Erişkin yaşlarda da görülebilmekte ve daha çok akciğerlerin hastalığı şeklinde ortaya çıkmaktadır (2). TB hastalığının tek yumurta ikizlerinde diğer ikizlerden daha sık görülmesi genetik etkenlerin de rolü olduğunu göstermektedir (7). MTB basili ile karşılaşan kişilerin 1/3'ü 4-12 haftalık bir kuluçka döneminden sonra enfekte olur ve bu kişilerin % 90'ı enfeksiyonu sınırlar. Ancak %10'undaki aktif enfeksiyon ve yıllarca sessiz kalan basilin tekrar aktive olarak hastalık oluşturabilmesi TB sorununun önemini artırmaktadır (8).

Hastalık temel olarak akciğerlerde görülmekle birlikte; lenf nodları, mediasten, genitoüriner sistem, kemikler, eklemler, santral sinir sistemi, deri, kardiovasküler sistem, dalak, karaciğer, pankreas, larinks, gastrointestinal sistem, peritonu tutabilir ve dissemine forma da dönüşebilir (1).

1.1.1 Bulaşma ve Semptomlar

TB, hava yoluyla insandan insana bulaşır. Hasta bireyin konuşma, öksürük ve hapşırması ile 1-3 basille yüklü 1-5 mikron çapındaki damlacıklar ortam havasına dağılır ve bunların solunmasıyla basiller terminal hava yollarına kadar ulaşır (9). Kaviteli akciğer lezyonu olanlar ve larinks tutulumu olanlarda bulaştırıcılık daha yüksektir. Hastalığın oluşabilmesi için hasta ile uzun süreli temas gerekmektedir. Kapalı ve kalabalık ortamlarda bulaştırıcılık daha fazladır. Yayma pozitif bireylerin,

yayma negatif bireylere oranla daha bulaştırıcı olduğu bilinmektedir (10). Hastalıktan korunmakta BCG aşısı kısmen etkili olabilmektedir. TB primer ya da reaktivasyon TB'ü şeklinde olabilir. Bir çok primer enfeksiyon vakasında lezyonlar iyi gidiş gösterir ancak basiller dokularda çoğalma göstermeden aylarca ve yıllarca canlılıklarını sürdürebilirler. Moleküler çalışmalar TB basilinin dekatlar boyunca sessiz olarak kalabileceğini ve akciğer makrofajlarında ve diğer özelleşmemiş fagositik hücrelerde MTB DNA'sı bulunabileceğini göstermiştir. TB vakalarının büyük kısmı eski lezyonların reaktivasyonu ile oluşmaktadır. Reaktivasyona predispozan faktörler; malnutrisyon, steroid tedavisi veya diyabet, lösemi, HIV gibi hastalıkların varlığıdır (1). Hastalığın ilerlemesi ile özellikle üst loblarda bilateral yoğun enflamasyon ve doku yıkımı ile kazeifikasyon ve kaviteasyon görülebilir. Sık görülen semptomlar öksürük, balgam, ateş, gece terlemesi, iştahsızlık ve kilo kaybıdır (11). Ancak bu semptomlardan hiçbirisi TB'a özgü değildir. Klinik tablo çok değişken olabilir. Genel durum son derece iyi, hafif öksürük, başka nedenlere bağlanan halsizlik ve iştahsızlık gibi silik semptomlardan hemoptizi ve solunum yetmezliğine kadar gidebilen ağır bir gidiş te gösterebilir (12).

1.1.2. Tüberkülozda Tanı Yöntemleri

Klinik, fizik muayene, laboratuvar bulguları ve radyoloji sadece TB'dan kuşulanmayı sağlar. TB'un yaygın olduğu toplumlarda onbeş günden fazla devam eden öksürüklerde ve şüpheli akciğer infiltrasyonunda TB'a yönelik tanı yöntemleri kullanılmalıdır (13).

Tüberkülin testi, TB enfeksiyonu sonucu oluşan geç ve hücresel tipteki bağışıklığı, aşırı duyarlılığı belirlemek için kullanılan deri testidir (14). Standart tüberkülin testi, ön kolun ön yüzüne cilt içine (Mantoux yöntemi) 0.1 ml 5TU PPD (Tüberkülin Ünitesi) (Purified Protein Derivative = Saflaştırılmış Protein Türevi) yapılarak 48-72 saat sonra endurasyon çapının ölçülmesi esasına dayanır. Tüberkülin testinde antijen olarak kullanılan, TB basillerinin proteinleridir (15). Tüberkülin testi, organizmanın TB basili ile karşılaşmış karşılaşmadığını, dolayısıyla basilin protein bileşenlerine karşı allerjinin oluşup oluşmadığını gösteren bir testtir; TB enfeksiyonundan 6-8 hafta sonra deride ortaya çıkan geç aşırı duyarlılık reaksiyonunun saptanması esasına dayanır (16).

Akciğer grafisinde özellikle üst zonlardaki radyolojik değişiklikler aktif TB'a

ait bulgular olabileceği gibi, önceden geçirilmiş TB enfeksiyonuna ait sekeller de olabilir. TB'a ait kavite veya fibrotik lezyon görülebilir. TB tanısında akciğer filmi önemli olsa da özellikle balgam yayma negatif hastalarda tek başına aktivite tayini için yeterli değildir (17). Mikobakterilerin hücre duvarlarının lipid içeriğinin yüksek olması, güçlü asit ve alkalilere olan direncinin diğer bakterilerden fazla olmasını sağlar. TB'un direkt gösterilmesinde materyal lam üzerinde Ziehl-Nielsen, Kinyoun tekniği veya Rodamin, Auramin gibi asit-fast metodlarla boyanır. Aside dirençli basilin (ARB) mikroskopik olarak görülmesi mikobakterilerin saptanması için yapılan en hızlı işlemdir. Ancak ARB (+) bulunması organizmanın tanımlanması ve canlılığı konusunda bilgi vermez çünkü nonTB mikobakteriler ve nokardia gibi mikroorganizmalar da pozitif sonuç verebilir. TB'un mikroskopik olarak tespit edilebilmesi için sabah erken saatlerde birbirini takip eden üç gün balgam örneği alınması gerekir. Balgam veremeyen hastalardan mide suyundaki pulmoner sekresyonları yakalamak için nazogastrik sonda ile sabah açlık mide suyu örnekleri alınabilir. Balgam ve mide suyu örnekleri ile tanıya ulaşılamayan hastalara Fiberoptik Bronkoskopi (FOB) uygulanıp bronş lavajı, bronkoalveoler lavaj, bronş biyopsisi ve transbronşial biyopsi örnekleri alınabilir (18-20). Sonuçlar negatif veya pozitif olarak yorumlanır. Basil varlığı sayısal olarak belirtilir. Bu hem tanı sırasında hastalığın ağırlığını göstermede hem de tedaviye yanıtı takip etmede önemlidir. Yaymanın tümünde 3-9 mikroorganizma varsa (+), yaymanın tümünde 10 ve daha fazla ise (++) büyük büyütmede her immersiyon sahasında 1 veya daha fazla ise (+++) olarak ifade edilir. Bu yöntemle ARB'nin gösterilebilmesi için örneğin mililitresinde en az 10^4 basil bulunması gerekir (19).

TB'un kesin tanısı bakteriyolojiktir ve tanısı için MTB basilinin kültürde üretilmesi altın standarttır. Materyalin mililitresinde en az 100 basil bulunduğunda pozitif sonuç verir ancak TB basili çok yavaş ürettiği için sonuç alabilmek için haftalarca (6-8 hafta) beklemek gerekir. Tüm materyaller, yayma pozitif olsun veya olmasın antibiyotik duyarlılık ve mycobacterium tür tayini için kültüre ekilir. Kültür için en sık kullanılan katı besi yerleri yumurta içeren Löwenstein-Jensen veya agar içeren Middlebrook H7 10–11'dir. Yüzde 60-80 sensitivitesi vardır (10).

Ayrıca basil varlığını daha hızlı tespit edebilmek için dekontamine, konsantre örnek karbon ile işaretlenmiş, palmitik asit eklenmiş sıvı kültür ortamına ekilir. MTB

bu maddeyi metabolize eder ve ortama CO₂ verir; CO₂ BACTEC aleti tarafından saptanır ve büyüme göstergesi olarak algılanır. Böylece mikobakteriler yayma pozitif olgularda 7-8 günde, negatif olgularda 16-20 günde olmak üzere daha kısa sürede BACTEC ile saptanabilmektedir. %70-95 sensitivitesi vardır (10, 18).

Seroloji MTB'e ait antijenlerin substrat olarak kullanılması yoluyla tanıya yardımcı olan bir methodur. %70 spesifisite, %90 sensitivitesi vardır (10). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)-DNA hibridizasyon, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) gibi moleküler biyolojik teknikler hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir(10). PCR ile mikobakteri belirlenmesi, mikobakteriyel DNA'nın çoğaltılarak ölçülebilir düzeye getirilmesi prensibine dayanır. PCR ile çok az miktardaki DNA rutin agaroz jel elektroforezinde görülebilecek düzeyde artırılır. Yapılan bazı çalışmalarda PCR'ın spesifitesinin düşük olduğu yalnızca PCR sonuçlarına göre TB tanısı konulup tedavi başlamanın uygun olmadığı bildirilmektedir (10, 21).

Transtorasik ince iğne aspirasyonu ile elde edilen örnekler, sitolojik TB tanısı açısından balgam ve bronşiyal lavaj sıvısından daha değerlidir (10). Yardımcı tanı yöntemleri olarak hematolojik ve biyokimyasal incelemeler de kullanılabilir. Eritrosit sedimentasyon hızında artış, anemi, lökositoz, trombositoz en sık rastlanan hematolojik değişikliklerdir (22).

Akciğer dışı TB'un tanısı için idrar örneği (sabah alınan orta akım idrarı), plevral, perikardiyal, serebrospinal ve peritoneal sıvı örnekleri yayma, kültür, biyokimya ve sitolojik inceleme için gönderilir. TB şüphesi olan hastanın biyopsi örnekleri hem patolojik hem bakteriyolojik olarak incelenmelidir ve nekrotizan granülomatöz iltihap araştırılmalıdır.

TB, MTB'e karşı oluşan immun cevap ve patolojik değişikliklerden oluşan hastalık olarak kabul edilir. MTB'e karşı birçok T-lenfosit alt grubunu içeren immun cevap oluşmaktadır, fakat T hücrelerince INF- γ üretimi hastalığın kontrolünde temel faktör olarak görülmektedir. Th1-tip sitokinler hafif ve orta derecedeki pulmoner TB'da baskın iken, Th2-tip sitokinler şiddetli hastalıkta baskındır. İmmun cevabın yetersiz kaldığı durumda hastalığı kontrol altına almak mümkün olmayacak ve hastalık kronik forma dönecektir, bu durumda geniş bir dizi regülatuar mekanizmalar devreye girmektedir. Sitokinler; glukokortikoidler ve

dehidroepiandrosteronun (DHEA) üretimine yol açan, immun cevapla hipotalamo-pituiter-adrenal aksın aktive olduğu sürede salgılanır. TB hastalarında plazma kortizol ve interlökin-6 seviyeleri artmış, DHEA ve testosteron seviyeleri azalmıştır, bunlarla birlikte growth hormon seviyesi belirgin olarak artmasına rağmen, insulin-like growth faktör-1 seviyesinde beklenen artış yoktur. Östradiol, prolaktin ve tiroid hormon konsantrasyonları da belirgin olarak artmıştır. Kortizol mikobakteriyel antijen çoğalmasını ve INF- γ üretimini inhibe ederken, DHEA ilerlemiş TB'lu hastalarda lenfoid hücreler tarafından üretilen TGF- β yı süprese eder. Bu tip immun endokrin etkileşimler doku hasarının kontrolünü ve koruyucu immun yanıtın gelişmesini etkileyebilir ve kısmen hastalığın alevlenmesini izah eder (1, 23).

MTB'in damlacık yoluyla alınması sonrası izlediği yol ve oluşan bağışıklık yanıtının aşamaları şöyledir:

1. MTB'nin alveole ulaşması aşamasında bakteri miktarı, temas süresi, bakterinin virulansı ve kişinin immünitesi önemlidir.
2. MTB'nin, alveoler makrofajlar, bölgeye gelen dentritik hücreler ve monositler tarafından algılanması, bağlanma ve fagositozu gerçekleşir. Bu aşamada CR3, CR1, CR4, CD14, mannoz reseptörü, surfaktan protein-A, bağlanma bölgesinde kolesterol birikimi önemlidir. MTB varlığının algılanması ve yangı yanıtının başlatılmasında makrofajlarda TLR2 ve TLR4, dentritik hücrelerde ise TLR9 daha önemli rol oynuyor.
3. Öldürme; oksidatif ürünler, nitrik oksit, asidifikasyon, lizozomal füzyon, degranulasyon ve granülozin ile olur.
4. Fagozitozun gerçekleşmesi makrofaj, özellikle dentritik hücreler tarafından aktivasyon uyarılarının verilmesi, ek uyarı molekülleri gösteriminin artması CD80, CD86, IL-12, IL-18, IL-23, IL27 ile T hücrelerinin uyarılması ve Th1 tipi yanıtın aktivasyonu ile olur.
5. Antijen sunumu aşamasında, MHC klas I, II ve Cd1 a-e molekülleri ile MTB antijenlerinin CD8+, CD4+ ve gamma/delta tipi reseptörü olan hücrelere sunulması.
6. Kazanılmış immün yanıtın başlaması, Th1 hücrelerden TNF- α , IL-2 ve INF- γ salınması, NK, CD8 hücrelerinin etkinleşmesi ile olur.
7. Makrofaj aktivasyonu ve enfeksiyonun sınırlanması, fagozom olgunlaşmasının

hızlanması, oksidatif ürünler, nitrik oksit, solute carrier family 11 member 1 (SLC11A1) gösteriminin artışı, otofajinin tetiklenmesi, MHC antijenlerinin artışı ile (7).

1.1.3. İmmün Sistem ve TB

Konağın tüberküloz enfeksiyonunu kontrol etme yeteneği, etkin bir hücrel immün cevap oluşturmaya bağlıdır. Hücrel immünite ise, spesifik antijenle karşılaşan T lenfositlerinin duyarlanması ve makrofaj fonksiyonlarını düzenlemek üzere medyatörler salgılaması ile olur. Yani hücrel immünitenin spesifitesi, primer olarak makrofaja değil, T lenfositlerine bağlıdır (24). Mikobakteriyel immünitede dominant olduğu düşünülen CD4+ T hücreleri, kompleksi tanır ve aktive olurlar. Aktive olan CD4+ T hücreleri ise lenfokinler salgılayarak, daha fazla makrofajın aktive olmasını sağlarlar.

INF- γ ise duyarlı T lenfositlerinden ve NK hücrelerinden salgılanan makrofaj aktivasyonunda önemli rolü olan bir sitokindir ve TB immunolojisinde çok önemli bir yere sahiptir (25). Bu sitokinler kan akımından lezyona monosit/ makrofajları çekerler ve onları aktive ederler. INF- γ ve TNF- α en önemli makrofaj aktive edici sitokinlerdir. Ayrıca makrofajlar reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünleri, lizozomal enzimler ve diğer faktörleri üreten fagositler oldukları için tüberküledeki basilleri yok edebilirler. INF- γ monosit/ makrofajlardaki IL-2 reseptörlerini uyardıktan sonra IL-2 bu hücrelerin basilleri öldürücü etkisini daha da artırır (26). MTB antijenleri ile duyarlı hale getirilmiş kişilerde T-hücreleri, mikobakteriyel antijenlerle karşılaştıklarında INF- γ üretmektedir. Bu nedenle, yüksek INF- γ üretim düzeyi TB enfeksiyonu için bir gösterge olarak kabul edilir.

IL-12 - INF- γ aksındaki tek gen hatalarının (IL-12 p40, IL-12RB1, IFNGR1, IFNGR2, STAT1) mikobakteri enfeksiyonlarına yatkınlıkla ilişkisi açıkça ortaya konulmuştur. Ancak bu grup, hastaların az bir kısmını oluşturmaktadır. Bu durum gen polimorfizmlerini araştırmaya yönelmiştir. Bu bağlamda, SLC11A1, Vitamin D reseptörü, IL-12 reseptörü, IL-1, IL-10, INF- γ , TNF- α , Toll-like receptor 2 (TLR2), ve TLR aktivasyon yolağında önemli olan TIRAP/Mal, insanda lpr1 (lipoprotein alleli 1) homologu olan SP110 polimorfizmlerinin TB hastalığına yatkınlıkla ilişkisi bildirilmiştir. Ancak bu konuda geniş serilerde ve değişik toplumlarda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır (7, 27).

Organizmaya giren MTB'in algılanmasında Toll benzeri reseptörler (TLR2, TLR4 ve TLR9) önemli rol oynar. Bu reseptörlerin uyarılması hücrelerden bir dizi aktivasyonlar yanında özellikle IL-12 ve TNF- α salınmasına yol açar. Son yıllarda IL-12p40 ve IL-12 reseptör hatası olan hastaların tanımlanması da bu sitokinin MTB ye karşı dirençte ne denli önemli olduğunu göstermiştir. IL-12'nin etkisine benzer etki gösteren ya da aktivitesini güçlendiren sitokinler konusundaki bilgilerimiz ise henüz yetersizdir. IL-23, IL-7, IL-18 ve IFN- α 'nın, INF- γ yapımı ve MTB ye karşı dirençle ilgili aktivasyondaki rolleri yeni anlaşılmaya başlanmıştır. Bu sitokinlerle ilgili klinik veriler henüz yetersizdir (7, 28).

Melatoninin immün sistem üzerine etkisi ile ilgili yapılan birçok çalışma immünomodülatör etkisini ortaya koymuştur. İlk olarak 1986'da Maestroni ve ark. ratlarda, melatonin sentezinin inhibisyonunun hücrel ve humoral yanıtı inhibe ettiğini göstermişlerdir (29). Melatonin, hematopoeziste genel bir uyarıcı etkiye sahiptir, GM-CFU'nin üretimini uyarır. Melatoninin monosit üretimi üzerine etkileri, melatonin reseptörleri üzerine direkt etkilerinden dolayı veya IL-3, IL-4, IL-6 veya GM-CSF gibi uyarılara monosit duyarlılığındaki bir artıştan dolayı olabilir (30). Melatonin, Th (CD4⁺) lenfositlerinin sayısını artırdığı gibi, monosit (CD14+/CD4+) ve T cell aktivitelerini artırarak; NK hücre aktivitesi ve antikor-bağımlı hücrel sitotoksiste (ADCC)'yi artırır ve doğuştan ve sonradan kazanılmış immüneyi destekler (31).

Fizyolojik olarak, melatonin Th1 sitokinleriyle ilişkilidir ve melatonin verilmesi Th1 üretimini destekler. Hem normal hem de lösemik farelerde; melatonin verilmesi virüsle enfekte hücreler ve kanser hücrelerine karşı savunmada aracılık eden NK hücrelerinin sayısal ve fonksiyonel artışı ile sonuçlanır (32). İnsanda ise günlük oral melatonin alımı NK hücre aktivitesini artırmakta, TNF- α , TGF- β , IL-1 β , INF- γ ve SCF gibi immün düzenleyici sitokinlerin gen ekspresyonlarını düzenlemektedir. Nokturnal melatonin seviyesi, yüksek İnterferon gama (IFN- γ)/IL-10 oranı ve Th1/Th2 oranında ritmisite ile uyumlu olarak bulunmuştur (31). Pineal bez ile immün sistem arasındaki etkileşim iki yönlüdür, IL'ler ve sitokinler (IFN- γ) de melatonin sentez ve salınımını etkiler (33).

Melatoninin immün sistem hücreleri üzerindeki olumlu etkileri sadece sitokin üretiminden kaynaklanmaz, aynı zamanda melatoninin antiapoptotik ve antioksidan

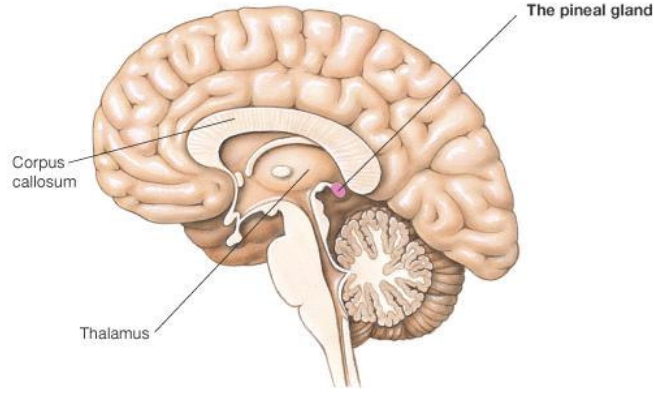
etkilerine de bağılıdır (5, 34, 35). Yapılan çalışmalar immün sistem hücreleri üzerine melatoninin etkisinin hem membran hem de nükleer bağlanma bölgeleri aracılığı ile olduğunu göstermektedir (36).

1.2. Melatonin

1.2.1. Genel Bilgiler

1958'de Yale Üniversitesi tıp fakültesinde Lerner ve ark.ları tarafından bulunan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), insanlar dahil tüm memelilerde epifiz olarak da bilinen pineal bezin esas ürünü olan bir nörohormondur (4, 37). İlk kez balık ve kurbağalarda renk açıcı molekül olarak bulunmuş ancak memelilerde pigment üzerine herhangi bir etkisi saptanmamıştır. Sonradan melatoninin bakteri, protozoon, bitki ve mantar ile birçok omurgalıda da sentez edildiği gösterilmiştir (38, 39). Bazı bitkilerin tohum ve yapraklarında tespit edilmiştir. Özellikle güçlü ultraviyole ışınlarına maruz kalan Alp'lerde ve bazı Akdeniz bölgesi bitkilerinde yüksek bulunmuş ve melatoninin onları oksidatif hasar ve çevresel zararlı etkilerden koruduğu bildirilmiştir (34). Çin'de yaygın olarak hazırlanan, özellikle yaşlanmayı geciktirmek veya serbest radikallerin yol açtığı hastalıklardan korunmak için kullanılan şifalı bitki karışımlarında 12-3771 ng/g gibi değişen miktarlarda melatonin bulunmaktadır (40).

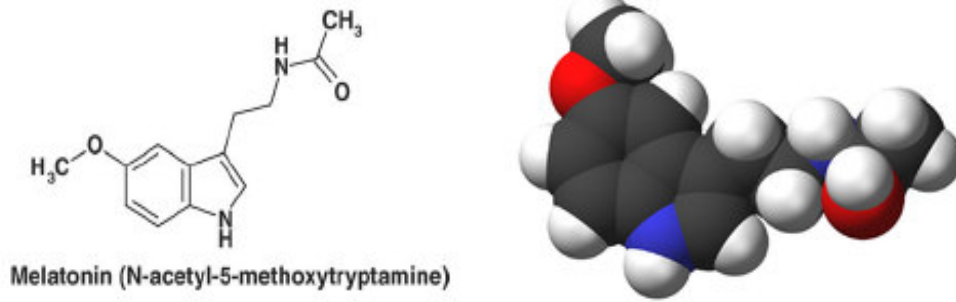
Pineal bez insanda colliculus superior'lar, pulvinar thalami ve splenium corporis callosi arasında yerleşmiş olup küçük, konik şekilli 120-150 mg ağırlığında bir organdır (Şekil1) Endokrin aktivitesi, diğer endokrin organlardan farklı olarak sinirsel innervasyona bağılıdır (41, 42).



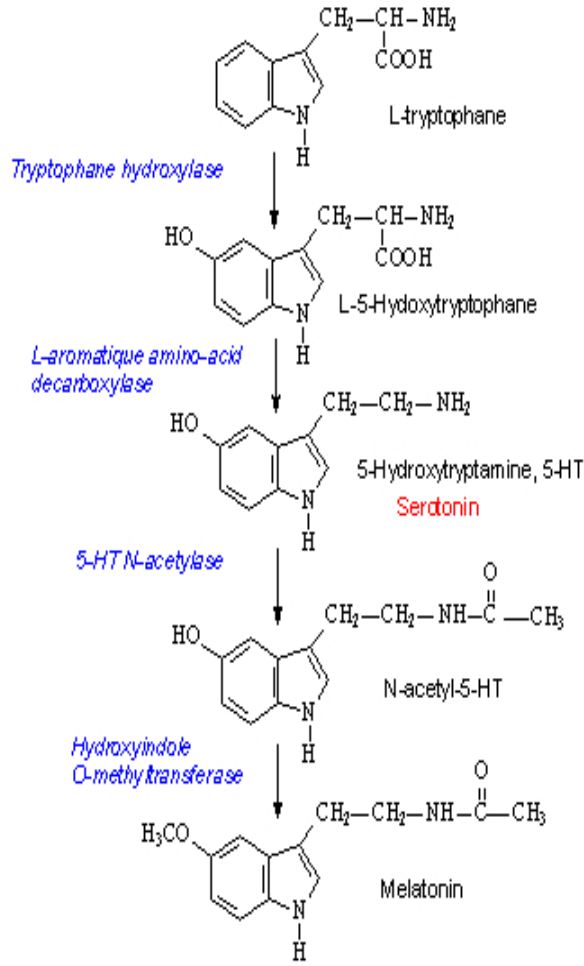
Şekil 1. Pineal bezin anatomik lokalizasyonu.

Melatonin triptofandan sentez edilir ve predominant olarak gece boyunca salgınır (43). Melatoninin içerdiği her iki fonksiyonel grubu reseptör bağlama spesifitesi için kararlıdır ve aynı zamanda molekülün çeşitli hücre kompartmanlarına geçişine, onun oksidasyon kimyasına izin veren bir indolamindir (Şekil 2) (44).

Melatonin prekürsörü olan seratoninin aksine hem lipofilik hem de hidrofilik özelliğinden dolayı kan-beyin, plasenta, neoplastik doku gibi bütün bariyerleri kolayca geçer (45). Anne sütüne de geçer ve anne sütü ile beslenen bebeklerin diğer bebeklere göre sirkadiyen organizasyonları daha çabuk gelişir, üçüncü aydan sonra ritmisite özelliği kazanır (46).



Şekil 2. Melatoninin moleküler yapısı (Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Molecules in focus melatonin. Int J Biochem Cell Biol 2006;38:313–316'den alınmıştır).



Şekil 3. Melatonin biyosentezi.

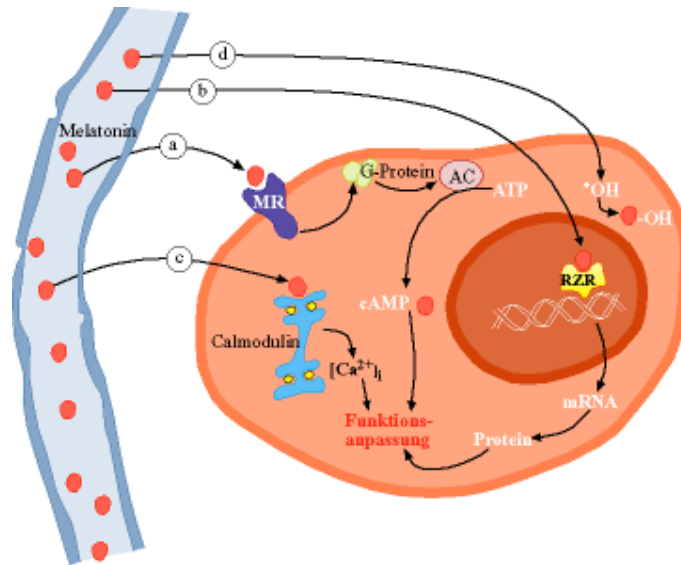
Prekürsör olan triptofan aminoasidi dolaşımdan hücre içine alındıktan sonra, triptofan 5-hidroksilaz enzimi aracılığı ile 5-hidroksitriptofan'a, 5-hidroksitriptofan ise 5-hidroksitriptofan-dekarboksilaz aracılığı ile serotonine (5-hidroksitriptamin) dönüşür. Serotonin de arylakylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) enzimi aracılığı ile asetillenerek N-asetilserotonini oluşturur. AA-NAT enzimi hız kısıtlayıcı enzimdir. N-asetilseratonin de hydroksiindol O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi aracılığı ile melatonine dönüşür (47) (Şekil 3).

Omurgalılarda melatonin başlangıçta pineal bezden salınan bir hormon olarak bulunmuşsa da daha sonra deri, retina, gastrointestinal sistem (GİS), kemik iliği ve lökositleri içeren çeşitli ekstrapineal bölgelerden de salındığı tespit edilmiştir. Daha sonra "diffüz nöroendokrin sistemin" bir parçası olarak kabul edilen Amine

Precursor Uptake Deamin (APUD) hücrelerinde ve gastrointestinal kanaldaki enterokromaffin hücrelerde de melatonin sentezinin yapıldığı gösterilmiştir (48, 49). Kemik iliğindeki melatonin düzeyi gece periferal kandaki düzeyinden 2 kat daha fazladır. Pineal bezi çıkartılmış ratlarda melatonin seviyesinin halen yüksek olarak görülmesi melatonin salınımının ekstrapineal olarak önemli bir kısmının kemik iliğinde sentezlendiğini göstermiştir (50).

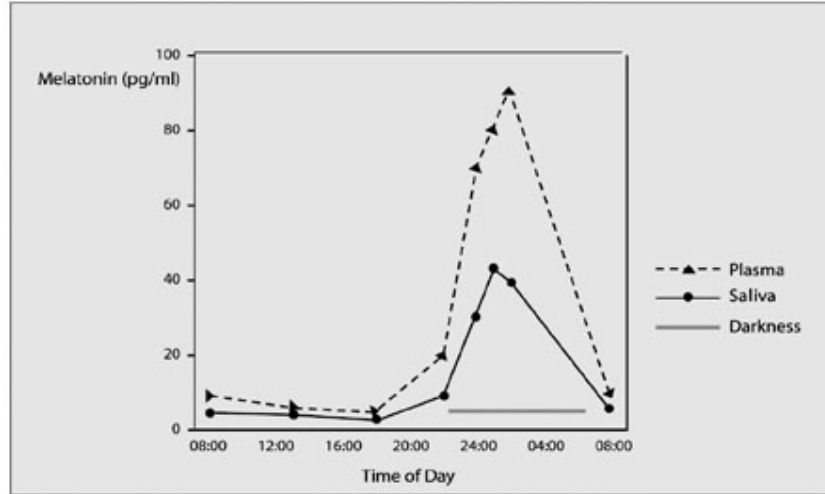
Yapılan çalışmalarda melatonin reseptörlerinin hem nöral dokularda hem de retina, dalak, eritrosit, lökosit, timus, tiroid, plasenta, endometrium, GİS ve neoplastik dokularda bulunduğu gösterilmiştir. Sinir sisteminde bulunan melatonin reseptörlerinin de melatonin hormonu gibi sirkadien bir ritim gösterdiği bulunmuştur. Hücre içinde nükleusta melatonin reseptörlerinin bulunduğunu, DNA üzerindeki etkinin bunlar aracılığı ile olduğunu göstermektedir (51).

MT1, MT2, MT3 olmak üzere melatonine afinitelerine göre üç tip melatonin membran reseptörü tanımlanmıştır. Ancak son çalışmalar MT3'ün melatonine bağlanan kısmının bir reseptörden ziyade bir enzim olduğu fikrini desteklemektedir. Membranöz lokalizasyonlu MT1 ve MT2'nin ise sinyallerin alınıp hücre içine doğru hücre membranı boyunca iletilmesini sağladığı bildirilmiştir. Melatonin ayrıca RZR/ROR ailesine ait nükleer reseptörler aracılığı ile de etki gösterebilir (Şekil 4) (52).



Şekil 4. Melatonin reseptörleri

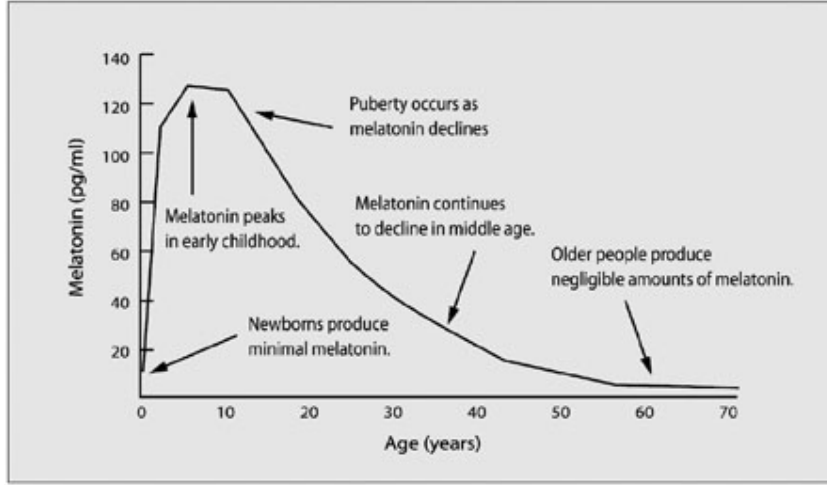
Kanda melatoninin %70'e yakın kısmı albumine, az bir kısmı orosomukoide ve hemoglobine bağlıdır, geri kalan % 30'luk kısım ise serbesttir (33, 53). Serum düzeyleri; gündüz daha düşükken (10-20 pg/mL), gece yarısı saat 02⁰⁰ -03⁰⁰ arasında pik yaparak (80-150 pg/mL) en yüksek düzeyine ulaşır (Şekil 5) (52). İntravenöz infüzyondan sonra melatoninin yarılanma ömrü yaklaşık 30 dakikadır (3, 54).



Şekil 5. Melatonin seviyesindeki diurnal değişiklikler. (Savvidou OD. MelatoninThe hormone of pineal gland and its relation to circadian rhythms and idiopathic scoliosis. Acta Orthop Trauma Hellenica 2006;57:4'den alınmıştır).

Kış ayları boyunca geceler daha uzun olduğu için yaz aylarına göre daha fazla melatonin salgılanmaktadır. Melatonin salınımı yaşa göre de değişiklik gösterir (Şekil 6). Waldhauser ve ark.larının yaptığı bir çalışmada yaşları 3 gün- 90 yaş arasında olan 367 kişide gece serum melatonin konsantrasyonlarına bakılmış ve yaşa bağlı olarak melatonin seviyelerindeki değişiklik gösterilmiştir. Yaşamın ilk 6 ayında $27,3 \pm 5,4$ (Ortalama \pm SD) pg/ml gibi çok düşük bir değerden 1-3 yaşlarında $329,5 \pm 42,0$ pg/ml gibi çok yüksek bir değere çıkmıştır. Daha sonra 15-20 yaşları arasında $62,5 \pm 9,0$ pg/ml olarak bulunmuş, bu değerler yaşlılık dönemine kadar bu şekilde devam etmiş ve 70-90 yaşları arasında tekrar $29,2 \pm 6,1$ pg/ml gibi çok düşük seviyelere inmiştir. Vücut ağırlığı ve vücut yüzey alanının artması ile ilgili olarak çocuk ve adölesanlardaki melatonin seviyesinin düştüğü ileri sürülmüştür. Çocuk ve

ergenlerdeki bu korelasyon sonraki yaşlarda (20-90 yaş) kurulamamıştır (55, 56). Cinsiyetin ise melatonin salınımı üzerine etkisi gösterilememiştir (46).

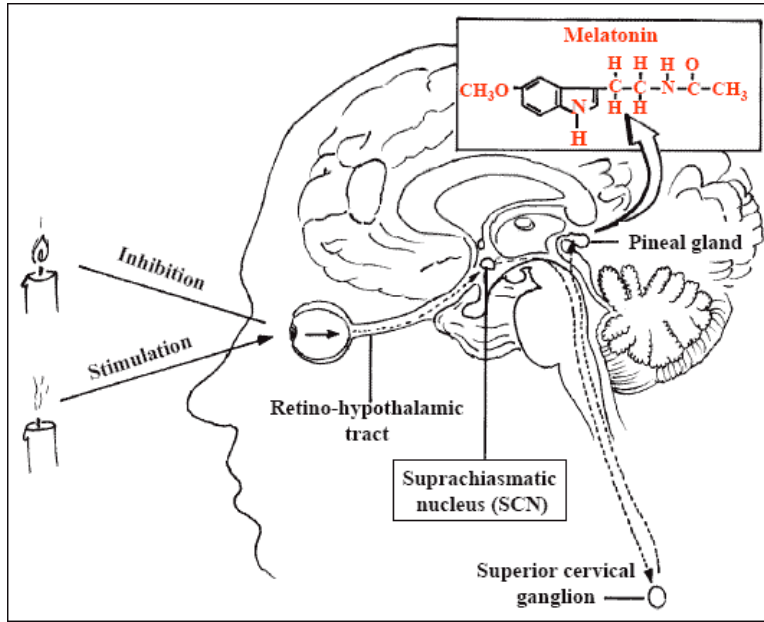


Şekil 6. Melatonin düzeylerindeki yaşlara göre değişiklikler. (Savvidou OD. Melatonin: The hormone of pineal gland and its relation to circadian rhythms and idiopathic scoliosis. Acta Orthop Trauma Hellenica 2006;57:4'den alınmıştır).

Melatonin normal çevresel koşullarda gece salınmakta olup, sentez ve salınımı ışık/karanlık döngüsüne göre ayarlanır. Gece olsa bile ortamda suni ışık bulunduğunda, suprakiazmatik nükleus (SCN)'tan pineal bez melatonin üretim emri gitmez ve üretilen melatonin konsantrasyonu azalır (34). Pineal bez, hipotalamus'ta yer alan SCN ile birlikte biyolojik bir saat gibi çalışır. Biyolojik saatler, bir organizmada zaman ölçmeye yarayan hücresel yapılardır. Pineal bez, sirkadiyan bir ritimde ve karanlıkta salgıladığı melatonin hormonu vasıtasıyla vücudun diğer kısımlarına zaman sinyalleri gönderir ve bu şekilde günün ve yılın farklı zamanlarına bağlı fizyolojik siklusların düzenlenmesinde görev alır (11). Işık uyarısının optik sinirle, SCN'a ulaşması ile SCN ve pineal bez arasındaki nöronal yapılar aydınlık ve karanlık hakkındaki bilgiyi pineal bez taşır ve melatonin sentezi bu bilgiye göre düzenlenir (34). Son yıllarda bu nöronal yolun ayrıntıları da ortaya konulmuştur. Bu yol hipotalamik paraventricüler nükleusu ve servikal spinal kordun intermediolateral kolon hücrelerine doğru, medial önbeyin yumağı ve retiküler formasyon aracılığı ile liflerin izdüşümlerini içerdiği gösterilmiştir. Ek olarak preganglionik sempatik liflerin superior servikal ganglion (SCG)'un üst kısmına doğru yönelir. Bu transmisyonun

son basamağında SCG'dan postganglionik sempatik lifler pineal beze ulaşır ve norepinefrin (NE) salınımını sağlar. Pineal β -adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu ile melatonin sentezi artar; pineal bezde bulunan α_1 adrenerjik reseptörler de β -adrenerjik reseptörlerin aktivitesini potansiyalize eder (33).

SCN elektrik aktivitesi, ışık fazı süresince yüksektir ve bu şartlar altında pineal NE salınımı inhibe olurken, karanlık süresince SCN aktivitesi inhibe olur ve pineal bezde NE salınır. β -adrenerjik blokerlerin insanlarda melatoninin nokturnal sentez ve sekresyonunu suprese ettiği gösterilmiştir (57). Eğer SCN gece ışıkla aktive edilirse, pineal bezde NE salınımı inhibe olur. Bununla birlikte melatonin sentezi üzerine ışığın supresan etkisi ile β -adrenerjik bloker propranololun farmakolojik etkisi arasında korelasyon yoktur, bu sonuca göre diğer noradrenerjik mekanizmalar rol oynuyor olabilir (Şekil 7) (58).



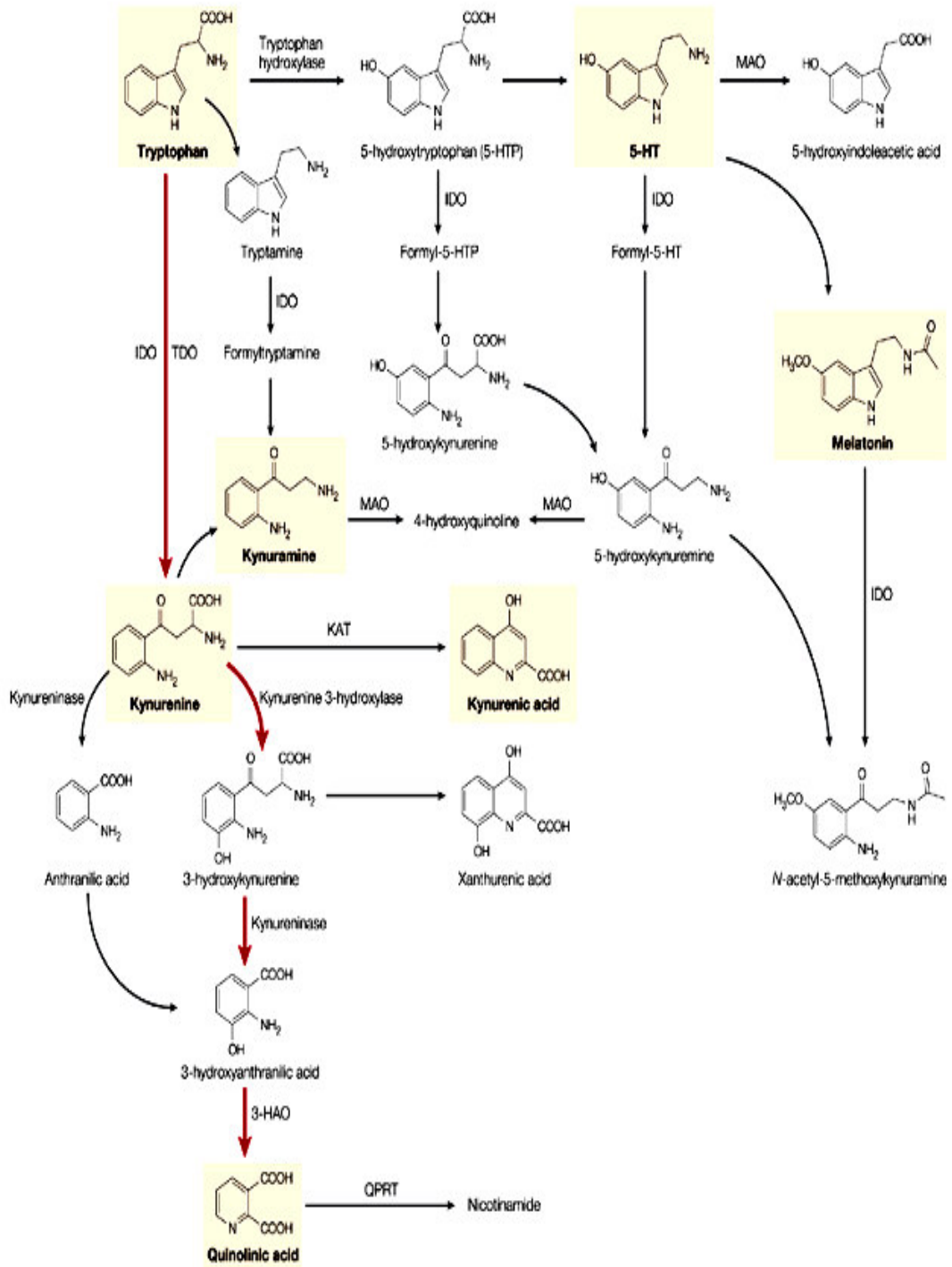
Şekil 7. Işık ve karanlık döngüsünün pineal glanddan melatonin salınımı üzerine etkisi. S. J. Konturek, P. C. Konturek, T. Brzozowski, G. A. Bubenik. Role Of Melatonin In Upper Gastrointestinal Tract-2007 'den alınmıştır

Melatonin sentezi, NE'in adrenerjik β_1 reseptörlere bağlanmasının ardından pineal adenilat siklazın aktive olması, siklik AMP (cAMP) ve *de novo* olarak N-asetil transferaz (NAT) veya onun aktivatörünün sentezinde artış ile başlar. cAMP

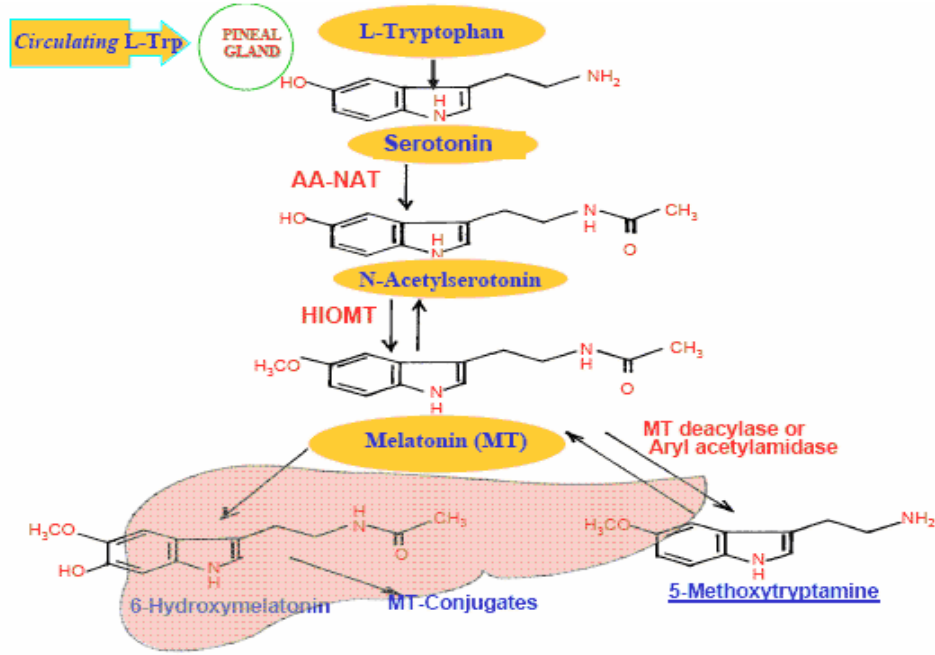
induced gene transcription repressor (ICER), NAT ile bağlandığında aktive olur ve melatoninin nokturnal üretimini sınırlayan mekanizmayı gösterir (59).

Melatonin triptofandan sentez edildiği için triptofan eksikliği melatonin sentezini etkilemektedir. Ayrıca folat ve vitamin B6 düzeyleri de, prepubertal dönemdeki çocuklarda melatonin üretimini uyarılmasında öneme sahiptir. Serotonin alımın inhibitörü olan fluvoxamine de plazma melatonin seviyesini artırır (33).

Uzun yıllar melatoninin yalnızca hepatik sitokrom P450 monooksijenaz ile katabolize edildiği, ana üriner metaboliti olan melatonin sülfat (6-sülfatoksimeletonin: 6-hidroksimeletoninsülfat) (aMT6S)'ın 6-hidroksimeletoninin konjugasyonu ile oluştuğu düşünüldü. Bu dolaşımdaki hormon için doğrudur fakat doku melatonin için şart değildir; çünkü santral sinir sistemi gibi bazı dokularda oksidatif pirol halkasının kırılması üstün gelebilir (60). Birincil kırılma ürünü, N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) dır, bu da hemoperoksidaz veya arylamine formamidase ile N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (APG/MLK)'ya döner. Son çalışmalar pirol halkasının kırılmasının total katabolizmanın yaklaşık 1/3'ine katkıda bulunduğunu göstermiştir ki bu bazı dokularda daha da yüksek olabilir. APG/MLK ve AMK ayrıca reaktif oksijen ve nitrojen türleri ile etkileşerek metabolitleri oluşturur (Şekil 8) (61). Karaciğer dolaşımdaki melatoninin %90'dan fazlasını temizleyerek katabolizmasını sağlar. Melatonin önce hidroksillenir, idrara daha çok sülfatlanmış olmak üzere sülfat ve glukuronid konjugatları olarak atılır. İdrardaki aMT6S, melatonin sekresyonunun bir ölçüsüdür ve gece profilini gösterir (Şekil 9) (33, 34).



Şekil 8. Triptofan metabolizmasının alternatif yolu. (Stone TW, Darlington LG. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery* 2002;1:609-620’den alınmıştır).



Şekil 9. Pinealositlerde L-triptofandan melatonin oluşumu ve karaciğerde metabolizması. (S. J. Konturek, P. C. Konturek, T. Brzozowski, G. A. Bubenik. Role Of Melatonin In Upper Gastrointestinal Tract-2007 'den alınmıştır).

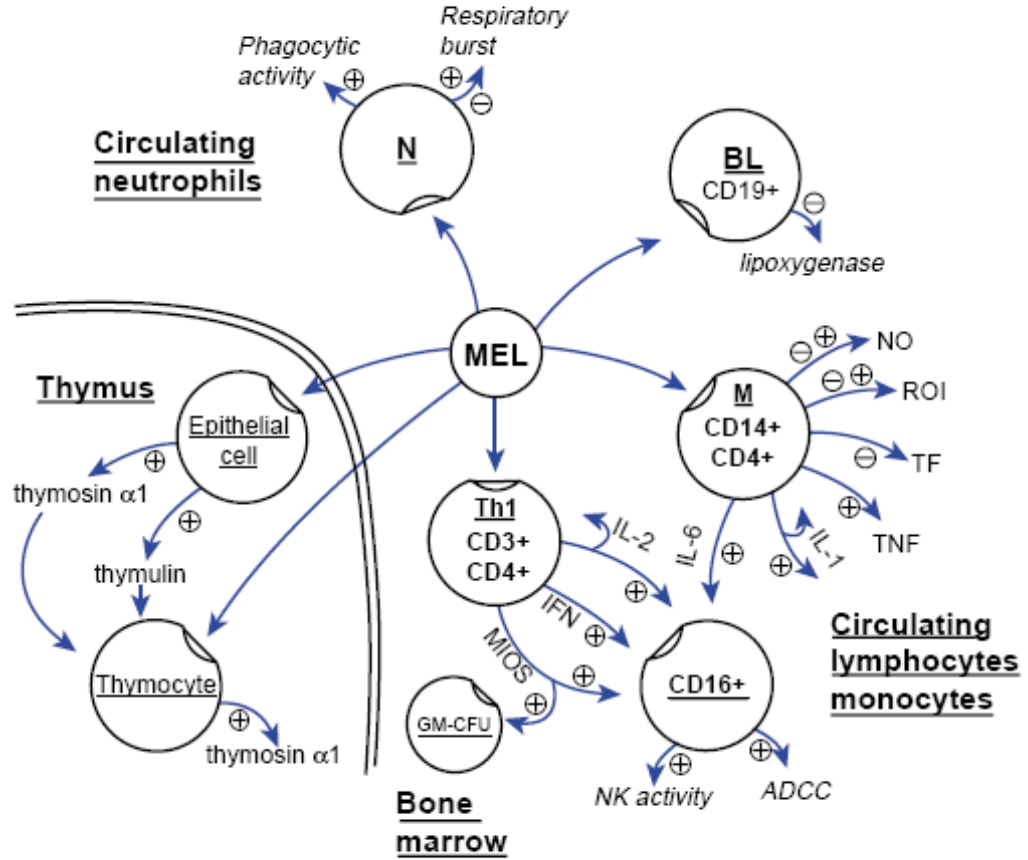
1.2.2. Melatoninin Etkileri

1.2.2.1. İmmün Sistem Üzerine Melatoninin Etkisi

Melatoninin immüneyi artırıcı etkileri yaklaşık 30 yıldır bilinmektedir. Melatoninin immün sistem üzerine etkisi ile ilgili yapılan birçok çalışma immünmodülatör etkisini ortaya koymuştur. İlk olarak 1986'da Maestroni ve ark. ratlarda, melatonin sentezinin inhibisyonunun hücrel ve humoral yanıtı inhibe ettiğini göstermişlerdir (29). Melatonin, hematopoeziste genel bir uyarıcı etkiye sahiptir, GM-CFU'ların üretimini uyarır. Melatoninin monosit üretimi üzerine etkileri, melatonin reseptörleri üzerine direkt etkilerinden dolayı veya IL-3, IL-4, IL-6 veya GM-CSF gibi uyarılara monosit duyarlılığındaki bir artıştan dolayı olabilir (30). Melatonin kültüre insan mononükleer hücrelerinde IL-2, IL-6 ve IFN- γ üretimini artırır. Ayrıca monositleri aktive ederek IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α ve ROS üretimini artırır. Melatonin Th (CD4⁺) lenfositlerinin sayısını artırdığı gibi, monosit (CD14⁺/CD4⁺) ve T hücre aktivitelerini artırarak; NK hücre aktivitesi ve ADCC'yi artırır ve granülosit ve makrofajlar için öncül hücrelerin üretimini uyarır, doğuştan ve

sonradan kazanılmış immüneyi destekler. Ayrıca olgun NK hücrelerinin litik fonksiyonlarını artırır. Pineal bez ile immün sistem arasındaki etkileşim iki yönlüdür, IL'ler ve sitokinler (IFN- γ) de melatonin sentez ve salınımını etkiler (33, 62, 63) .

Yapılan çalışmalara göre melatoninin B hücreleri üzerine direkt bir etkisi gösterilememiş dolayısı ile humoral immünite üzerine artırıcı etkisi ve melatonin reseptörleri de tespit edilememiştir (31). Ancak başka bir çalışmada melatonin B hücreleri aracılığı ile 5-lipooksijenazı inhibe ettiği, timik epitelial hücreler aracılığı ile thymosin 1 α ve thymulini artırdığı gösterilmiştir (36, 64) (Şekil 10).



Şekil 10. Melatoninin immün sisteme etkisi. (Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2003;17(2):273–285,'den alınmıştır).

İnsan lenfositlerinden sentezlenen melatonin IL-2 üretimini stimüle eder. Nokturnal melatonin seviyesi, yüksek IFN- γ /IL-10 oranı ve Th1/Th2 oranında ritmisite ile uyumlu olarak bulunmuştur (31).

İnsanda günlük oral melatonin alımı NK hücre aktivitesini artırmakta,

TNF- α , TGF- β , IL-1 β , INF- γ gibi immün düzenleyici sitokinlerin gen ekspresyonlarını düzenlemektedir (4, 5) ayrıca Th1 üretimini destekler. Hem normal hem de lösemik farelerde; melatonin verilmesi virüsle enfekte hücreler ve kanser hücrelerine karşı savunmada aracılık eden NK hücrelerinin sayısal ve fonksiyonel artışı ile sonuçlanır (6).

Kemik iliğinde sürekli çoğalarak farklılaşan öncül hemapoetik hücreler, akut ve kronik oksidatif streslerden zarar görürler. Melatoninin immün sistem hücreleri üzerindeki olumlu etkileri sadece sitokin üretiminden kaynaklanmaz, aynı zamanda melatoninin antiapoptotik ve antioksidan etkilerine de bağlıdır (34). Yapılan çalışmalar immün sistem hücreleri üzerine melatoninin etkisinin hem membran hem de nükleer bağlanma bölgeleri aracılığı ile olduğunu göstermektedir, nükleer bağlanma bölgelerine melatoninin bağlanması ise nükleer melatonin reseptörü RZR/ROR'un spesifik bağlar ile yer değiştirmesi sonucudur (36). Eksojen olarak verilen melatoninin, stres ve ilaç tedavisi sonrası gelişen immün yetmezliği azalttığı ve kanser kemoterapisinde kullanılan ajanların hematopoetik prekürsör hücreler üzerine olan toksik etkilerinden koruduğu gösterilmiştir (64, 65).

1.2.2.2. Antioksidan Olarak Melatonin

Son yörüngesinde eşleşmemiş elektron bulunduran atom, atom grubu veya moleküllere serbest radikaller denir. Vücutta normalde aerobik metabolizma sonrasında süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot -}$) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) gibi reaktif oksijen türleri oluşur. Bu serbest oksijen radikallerinin doymamış yağ asitlerinde lipid peroksidasyonuna yol açarak hücrel hasar meydana getirmeleri antioksidan sistemler ile engellenir. Esansiyel aromatik amino asid triptofandan türeyen indoller ve özellikle melatonin, elektron transferinin düzenlenmesinde, reaktif ara ürün radikallerinin detoksifiye edilmesinde, peroksidatif reaksiyon zincirlerinin güçlü bir şekilde kontrol edilmesinde rol oynamaktadır (33). İn vitro olarak melatoninin direkt olarak $\cdot OH$, hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (1O_2)'i temizler ve lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Melatonin, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-redüktaz) ve katalaz (CAT)'ı içeren bir grup antioksidan enzimleri de stimüle eder. Diğer yandan pro-oksidan enzim nitrik oksit sentazı inhibe eder (33). Lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarına yol açarak direkt toksik etki gösteren peroksinitrit ($ONOO^{\cdot -}$) ile uyarılan

hücrel toksisiteye karşı da belirgin faydalı etkileri vardır (55). Hücre içi glutatyon düzeylerini artırır. Glutatyon da nitrik oksit sentaz ve lipooksijenaz gibi peroksidatif enzimleri inhibe eder, mikrozomal membranları stabilize eder ve oksidatif hasara karşı korur. Serbest radikallere maruziyet sonrası oluşan hasarlı DNA ürünü olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin oluşumunu da azaltır (66, 67).

Melatonin ayrıca elektron transport zincirinin etkinliğini artırır ve mikrozomal membranları stabilize ederek oksidatif hasara karşı dirençli olmaya yardım eder (43) ve hasarlı dokularda nötrofillerin infiltrasyonunu inhibe ederek ilave faydalı etkiler de sağlar(68). Bulgular göstermektedir ki melatonin doğal analoglarının çoğundan daha etkili bir antioksidandır (44). Melatonin hem yağda hem de suda çözünür özelliğe sahip olması nedeniyle, vücudun her hücresine ve hücre içindeki yapılara kolaylıkla girer ve bu sebeple de vitamin ve mineral antioksidanlara göre çok daha etkilidir (69). E vitaminine göre en az iki kat, glutatyona göre beş kat daha etkili bir antioksidan olduğu gösterilmiştir (70). Aynı zamanda E vitamini kan-beyin bariyerini geçemezken melatonin geçerek antioksidan etkinlik gösterir (45).

Melatoninin yalnızca kendisi değil metabolitleri aracılığı ile de antioksidan özellik gösterir. Cyclic 3-hidroksimelatonin serbest radikalleri temizler (71). Melatoninin H₂O₂ ile oksidasyon mekanizmasında da temel mekanizmanın majör atılım ürünü olan APG/MLK ile ilgili olduğu da gösterilmiştir (72). Cyclic 3-hidroksimelatonin ve APG/MLK aynı zamanda toksik reaktantları temizleme özelliğine sahiptir. Bu döngü melatoninin *in vivo* olarak tahmin edilenden fazla olan serbest radikal hasarını azaltma özelliğini açıklamaktadır. Diğer bir ürün olan AMK ise melatoninin ana hepatik enzimatik metaboliti olan 6-hidroksimelatonin gibi bazı oksijen kaynaklı reaktanların nötralizasyonunda etkilidir (73).

Melatoninin; iskemi-reperfüzyon hasarı, toksik ilaç maruziyeti, bakteriyel toksin maruziyeti, şistozomiyazis, ağır metal zehirlenmesi, amiloid-b protein maruziyeti, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin maruziyeti gibi serbest radikal hasarı ile ilişkili olan klinik durumlarda oksidatif hasarı azaltarak koruyucu etki gösterdiği deneysel hayvan modellerinde gösterilmiştir (36, 74). Böylece dejeneratif ve proliferatif değişikliklere neden olan hastalıklara karşı nükleer DNA'yı, membran lipidlerini ve sitozolik proteinleri korur (69).

1.2.2.3. Melatoninin Karsinogenez Üzerine Etkisi

Pinealektomi yapılmış hayvanlarda çeşitli tümörlerin gelişiminde artış saptanması ve bu hayvanlarda eksojen melatonin uygulanması ile tümör gelişiminin inhibe edilmesi sonucu melatoninin kanserle ilgisini araştırmak üzere çok çeşitli kanser tipleri üzerinde çalışmalar yapılmış ve anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır. Melatoninin indol yapısından dolayı kanser hücre proliferasyonunu, tümör büyümesini ve metastaz insidansını azalttığı ancak yaşlanmayla birlikte melatoninin üretimindeki azalma sonucu yaşlılarda kanser sıklığının arttığı gösterilmiştir (31, 75). Tümör inhibisyonunun yanında melatoninin, serbest radikalleri ortadan kaldırarak serbest radikal aracılı DNA hasarının azaltılması ile de yeni tümör oluşum insidansını azaltmaya katkıda bulunduğu gösterilmiştir (31, 76).

Melatoninin özellikle meme tümörleri (77) ve kolon tümörleri (78) üzerindeki inhibitör etkisi iyi bilinmektedir. Meme, prostat, uterus, akciğer ve kolorektal kanserleri olan insanlarda azalmış melatonin seviyesi tespit edilmiştir (79). Son çalışmalar göstermiştir ki pinealektomi'de (80, 81) olduğu gibi, sürekli ışığa maruz bırakılmak da (82) bazı rat türlerinde meme tümörü oluşmasını artırmaktadır (83).

Melatonin fizyolojik konsantrasyonda kültür ortamında hücre proliferasyonu ve invazyonunu inhibe eder. Anisimov ve ark.ları dişi farelerde meme kanserinde melatoninin inhibitör etkisini göstermişlerdir. Subkutan olarak 50 µg/gün dozda melatonin verilen ratlarda tümör boyutları % 51 oranında azalmıştır (84). Meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda melatoninin östrojen yanıt yolağını da düzenlediği gösterilmiştir (85). Meme kanseri hücre kültürlerinde yapılan bir çalışma göstermiştir ki melatonin, aromataz enzim inhibisyonu ile antiöstrojen etki göstermektedir. Böylece hormon reseptör pozitif meme kanserinden korunmada ve tedavisinde melatoninin etkili olabileceği bildirilmiştir (86, 87).

Melatonin, ayrıca meme kanser hücrelerinin gelişiminin düzenlenmesindeki nükleer reseptörlerin (ERa, GR ve RAR) transkripsiyonel aktivitesini düzenler ve doğal östrojenler ve xenoöstrojenler ile indüklenen ekspresyonu ve telomeraz aktivitesini inhibe eder (88). Ayrıca, hücre siklusundaki G1-S faz geçişini geciktirerek, normal ve kanserli hücre bağlantılarını iyileştirerek ve intrasellüler redoks durumunu değiştirerek tümördeki anjiogenezisi azaltır (31, 76).

Meme kanseri etyolojisinde birçok faktör suçlanmasına rağmen gece vardiyalı

çalışan kadınlarda ışıkla melatoninin supresyonuna bağlı olarak meme kanseri görülme insidansının artması meme kanserinde melatonin eksikliğinin sorumlu olabileceğini göstermiştir (89). Gece vardiyalı çalışan premenopozal kadınlarda yapılan bir çalışmada da yüksek düzeylerde östradiol seviyesinin tersine idrar aMT6S konsantrasyonunun %56 oranında azaldığı gösterilmiştir (90). Melatonin kolon kanserlerinin diferansiasyonunu artırırken tümörün çeşitlilik ve büyüklüğünü inhibe eder (43).

Melatoninin melanoma üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Milimolar ve mikromolar seviyelerde uygulanan melatoninle yapılan çalışmalardan birinde milimolar düzeydeki melatonin, B7 melanoma hücre çizgisinin proliferasyonunu inhibe ederken, mikromolar düzeydeki melatonin, bu hücrelerin proliferasyonunu stimüle ettiği bulunmuştur. Ancak yapılan bazı çalışmalarda da bunu desteklemeyen, mikromolar konsantrasyonların proliferasyonu inhibe ettiği sonuçlar da alınmıştır. Bunun sebebi tam anlaşılmasına rağmen büyük ihtimalle melatonin reseptörlerinin (MT1 ve MT2) ayrıca melanoma hücreleri üzerinde lokalize diğer reseptörlerle ilgili olabileceği üzerinde durulmuştur. Diğer farklı kanser tipleri (over, mide, oral kavite, endometrium, karaciğer vb.) üzerinde yapılan çoğu çalışmada ise melatoninin neoplastik hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (43, 52).

Oksidatif stres karsinogenezin birçok aşamasında belirgin bir rol oynar. Reaktif oksijen türleri nükleik asitler, lipidler ve proteinlerin oksidasyonuna yol açarak DNA üzerinde istenmeyen değişikliklere ve böylece neoplastik değişikliklerin başlamasına yol açar (52). Günümüzdeki çalışmalar melatoninin antikanser mekanizmasının onun, antiproliferatif, antioksidan etkisi ve konak üzerindeki immünstimülatör etkisine bağlı olarak gerçekleştiğini göstermektedir (33). Fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonlarda birçok hücre kültüründe ve *in vivo* sistemde antioksidatif korunma yaptığı gösterilmiştir (85).

Kanser hastalarında melatonin kullanılarak sonuçlarının değerlendirildiği çalışmalar, melatoninin sadece hematopoezi desteklemediği, aynı zamanda kanser kemoterapisinin verimliliğini böylece hastalardaki yaşam süresini ve kalitesini artırdığını göstermiştir (31). Melatoninin sisplatin, etoposid, antrasiklinler, 5-florourasil vb kemoterapetik ajanların toksisitesini azalttığı (91) gibi radyoterapi

sırasında tedaviye eklendiğinde radyoterapinin yan etkilerini azalttığı, yaşam süresini artırdığı gösterilmiştir (92). Bu konuda yapılan çalışmaların sonucunda çağımızın en çok görülen ve en çok öldüren hastalıklardan biri olan kanser tedavisinde daha büyük başarılar gösterilecektir.

1.2.2.4. Yaşlanma ve Melatonin

Yaşlanma tüm canlılar için bir takım moleküler değişikliklerin ve fonksiyonel bozulmaların görüldüğü, patolojilerin arttığı kaçınılmaz bir durumdur. Yapılan çalışmalar melatonin hormonunun da yaşlılıkta miktarı değişen hormonlardan biri olduğunu göstermiştir. Melatonin sekresyonunun yaşla birlikte azalmasının pineal bezdeki kalsifikasyona bağlı olabileceği üzerinde durulmaktadır (93). Yaşa bağlı olarak immün sistemdeki bozulma 60'lı yaşlar civarındadır ki bu da melatonin seviyesindeki azalmanın başladığı dönemle uyumludur. Melatoninin gece/ gündüz ritmi de yaşlılarda gençlere göre bozulmuştur. Kognitif, psikolojik ve sosyal bozukluklar ve uyku bozuklukları artar. İmmün sistem zayıflar, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve dejeneratif hastalıkların görülme ihtimali artar (94, 95).

Yaşla birlikte T ve B lenfositlerindeki progresif azalma, NK hücre fonksiyonlarında yetersizlik, yaşlanmayla artan bazı hastalıklarda sorumlu olarak görünmektedir. Yine yaşlanma ile birlikte makrofaj ve granülositlerde bozulma ve hücreiçi fagositik aktivite ile degranülasyonda azalma, kemotaktik ve fagositik aktivitede azalma görülmektedir. Ayrıca yaşlanma ile vücudun strese karşı yanıtı azalır. Bazı hormonlar immün fonksiyonların korunmasında önemlidir. Endokrin sistem ve immün sistem arasındaki ilgi normal insan fizyolojisi ve yaşla ilgili dejeneratif hastalıklar açısından önemlidir. Yaşla birlikte azalan Growth hormon, östrojen, dehidroepiandrosteron ve özellikle de melatonin hormonları immün yanıtı artırmak açısından çok önemlidir (94). Ancak kadınlarda menopoza döneminde melatonin seviyesinde geçici bir yükselme görülmüş ki bunun da östrojendeki belirgin azalma ile ilgili olduğu düşünülmüştür (96).

Bütün bunların sonucunda melatonin kullanılması ile yaşlanmanın geciktirilip yaşam kalitesinin ve süresinin uzatılabileceği fikrini akla getirmiş ve bu konuda bazı çalışmalar yapılmıştır. Anisimov ve ark.larının yaşam süresi yaklaşık 30 gün olan ve meyve sineği olarak bilinen *Drosophila melanogaster*'in strain HEM tipi üzerinde yaptığı çalışmada, 2.-3. larva dönemlerinde beslenme ortamlarına 100 µg/ml

melatonin eklenmiş ancak yaşam süresi üzerine bir etki gösterilememiştir (97). *D. melanogaster wild strain Canton-S* tipinde ise yine larva dönemlerinde beslenme ortamına 800 µg/ml melatonin eklenmiş ve ortalama yaşam süresi erkeklerde %10'dan %18,5'a, dişilerde ise %2,3'ten %12,1'e değişmiştir (98). Bununla birlikte *D. melanogaster Oregon wild strain* tipinde ise 100 µg/ml konsantrasyonda beslenme ortamına eklenen melatonin, bunlarda belirgin olarak yaşam süresini uzatmıştır. Maksimum hayat süresi kontrollerde 61,2 gün iken melatoninle beslenen grupta 81,5 gün olarak tespit edilmiştir (99). Melatoninin, meyve sineklerinin bütün hayat sürelerinde yiyeceklerine eklendiğinde ise anlamlı şekilde yaşam sürelerini uzattığı tespit edilmiştir (43). Ancak bu konuda halen kesin sonuçlar bildirecek yeterli çalışmalar mevcut değildir.

1.2.2.5. İskelet Sistemi ve Melatonin

Melatonin farmakolojik dozlarda insan osteoblastlarında proliferasyonu ve alkalin fosfataz aktivitesini stimüle eder. Ayrıca tip 1 kollajen, osteopontin, kemik siyaloprotein ve osteokalsin için mRNA'nın ekspresyonunu doz bağımlı olarak artırır ve *in vitro* olarak mineralize matriks formasyonunu stimüle eder (100). Melatoninin klinik olarak etkileri de araştırılmış ve civcivlerde yapılan deneysel pinealektomi sonrası insanlardaki idiyopatik skolyoza benzer spinal deformiteler görülmüş (101) ve bundan melatoninin eksikliği sorumlu tutulmuş, daha sonra pineal bezin otogreftlenmesi ve melatoninin yerine konması ile pinealektomize tavuklarda skolyoz gelişimi önlenmiştir (102). Machida ve ark. da stabil skolyozlu ve sağlıklı bireylere kıyasla progresif skolyozu olan bireylerde serum melatonin seviyesinin belirgin olarak düşük olduğunu göstermişlerdir (103). Brodner ve ark.larının 9 vakalık bir hasta grubu üzerinde yaptıkları çalışmada ise kontrol grubuna kıyasla serum melatonin ve üriner 6-hidroksi-melatonin-sülfat atılımında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiş ve böylece adolesan idiyopatik skolyoz etiyolojisinde melatonin eksikliğinin bir faktör olabileceği hipotezi doğrulanmamıştır (104).

Ayrıca melatonin *in vitro* olarak kortikosteroid ile tedavi edilen ratların kemik örneklerinde artmış kalsiyum alınımını inhibe ettiği gösterilmiştir (105). Melatoninin kemiklerdeki osteoklastik aktiviteyi önlemesi de muhtemelen melatoninin antioksidant aktivitesine bağlı olarak oluşmaktadır (34). Melatonin eksikliğinin postmenopozal osteoporozda da rol oynadığı ileri sürülmüştür (106). Kesemenli ve

ark.ları travmatik beyin hasarlı hastalarda erken ve aşırı kemik iyileşmesi ile hipertrofik kallusun, beyin omurilik sıvısında bulunan yüksek melatonin ile ilgili olabileceği hipotezini ileri sürmüşlerdir (107).

1.2.2.6. Kardiyovasküler Sistem ve Melatonin

Kalp, günün farklı saatlerinde farklı çevresel ve fizyolojik koşullara bağlı olarak uyum gösterir. Bu uyumda da periferik ve santral kaynaklı birçok nöronal ve hormonal faktörün rolü vardır. Kardiyovasküler sistemde kalp hızı, kan basıncı ve vasküler tonusta sirkadiyen değişiklikler görülmektedir. Gece kalp hızı, kan basıncı ve vasküler tonus azalır. Kardiyovasküler sistem sirkadiyen ritmine bağlı olarak belli dönemlerde kardiyak ve serebral olaylarda artış meydana gelir. İnsanlarda gece ışık uygulaması ile kalp hızının sirkadiyen ritminin bozulduğu görülmüş ve melatoninin de kalp hızının sirkadiyen ritmi üzerine etkisi olduğu gösterilmiştir (108, 109). Melatoninin hem sağlıklı bireylerde hem de hipertansif hastalarda sistolik ve diyastolik kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir. Melatonin uygulanmasından sonra kan basıncındaki düşmenin pulse index ve norepinefrin seviyelerinin düşmesi ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Bu etkinin sempatik sistem inhibisyonuna ve postsinaptik α -1 adrenerjik reseptör blokajına bağlı olduğu da düşünülmektedir (110). Hipertansif tedaviye gece melatonin eklenmesi kan basıncının daha fazla düşmesini sağlamıştır. Ancak Nifedipin ile birlikte yapılan çalışmalarda ise melatonin tam tersi etki göstererek kan basıncını ve kalp hızını artırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmaların sonucu olarak hipertansif hastaların kontrolsüz melatonin kullanmaları engellenmelidir. Bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (111, 112).

Koroner arter hastalarında yapılan çalışmalarda da, kontrol grubuna göre koroner hasta grubunda gece melatonin ve idrar 6-sülfatoksimeatonin düzeyleri daha düşük olarak bulunmuştur (113, 114).

1.2.2.7. Melatoninin Diğer Etkileri

Melatonin vücut ısısını düzenler. Vücut ısısı da sirkadiyen bir ritm gösterir ve uyku sırasında vücut ısısı en düşük seviyededir (115).

İnsanlarda uyku zamanının ve nokturnal melatonin salınımındaki artışın ilgisi uykunun düzenlenmesinde melatoninin gerekliliğini düşündürmüştür (34). Çalışmalar melatoninin uykuya dalış hızını, uykunun süresini ve kalitesini artırdığını da göstermiştir. Bu etkileri de muhtemelen glutamik asit üretimi ve glutamat

reseptörünün düzenlenmesi ve γ -amino-n-butirik asit (GABA) reseptör potansiyalizasyonu yolu ile olmaktadır (85). Bu nedenle günümüzde uyku bozukluğu tedavisinde de kullanılmaktadır.

Kluster tipi baş ağrısı ve migren tedavisinde de başarılı sonuçlar alınmış ve bunun da melatoninin antiinflamatuvar etkisi, NO sentaz aktivitesi, GABA reseptör potansiyalizasyonu ve glutamat nörotoksitesinin inhibisyonu aracılığı ile ilgili olduğu ileri sürülmüştür (85). Doğal analjezik özelliği ve santral sinir sistemi üzerine depresan etkisi aracılığı ile de kanser ağrılarını azalttığı klinik çalışmalarla gösterilmiştir (116).

Melatoninin otoimmün hastalıklarla da ilgisinin olduğu örneğin; romatoid artritli hastaların sağlıklı bireylere göre nokturnal melatonin seviyesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (34).

Tekbaş ve ark.ları da yapmış oldukları çalışmada melatoninin gram negatif mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkinliği olduğunu göstermişlerdir (117).

Günümüzde melatonin, uyku bozukluğu ve jet lag tedavisinde popüler bir tedavi yöntemidir. Bazı çalışmalar epilepsi, tinnitus ve migren gibi hastalıklarda da başarılı olduğunu göstermiştir. Ayrıca epilepsi, Parkinson hastalığı, stres, kan basıncını ve seksüel yaşamı düzenlemede, nöro-dejeneratif bozukluklarda, depresyon, otoimmün hastalıklarda, immün fonksiyon zayıflığında, antioksidatif korunmada da başarılı olduğu iddia edilmektedir (85).

1.2.2.8. Melatonin ve Melatonin Sülfat Ölçümünde Kullanılan Analitik Yöntemler

1.2.2.8. 1. Melatonin Ölçüm Yöntemleri

1.2.2.8.1.1. Radyoimmünassay (RIA): Bağışıklık reaksiyonlarının spesifikliğini radyokimyasal yöntemler ile birleştiren bir analiz yöntemidir. Bu metotta hormon tayininde sıklıkla I^{125} olmak üzere bir radyoaktif element kullanılır. Deney ortamına ölçülmek istenen hormonun antikoru, I^{125} ile işaretli hormon ve işaretli hormon konulur. İşaretli antijen ile işaretli antijen (ölçülmek istenen hormon) antikora bağlanmak için yarışır. Çalışma sonucunda tüpteki sıvı kısım dökülür, tüp cidarına bağlı olan işaretli Ag-Ab kompleksi ve işaretli Ag-Ab kompleksi kalır. Bu kompleksdeki I^{125} in yaymış olduğu gama ışınları gama sayıcıda sayılır. Sayılan miktar serumdaki hormon miktarı ile ters orantılıdır. Çünkü

serumdaki işaretli antijen miktarı arttıkça işaretli antijenin antikor ile yapacağı kompleks miktarı azalır. Yöntem melatonin ölçülümünde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin Kulczykowska ve ark.ları yaptıkları çalışmada serum melatonin düzeylerini ticari kit kullanarak RIA yöntemi ile ölçmüşlerdir. Bu yöntemde melatonin ekstraksiyonu için, Octadecyl C₁₈ Speedisk solid faz ekstraksiyon (SPE) kolonları kullanılmıştır. Ölçülebilir en düşük konsantrasyon 3.0 pg/mL dir ve sırasıyla gün içi ve günlerarası tekrarlanabilirliği sırası ile %8,1 ve 14,9 dur (118).

1.2.2.8.1.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA): Tekniğin prensibi RIA'da olduğu gibi Ag-Ab arasındaki reaksiyona dayanır. RIA'ya alternatif olarak geliştirilmiştir. Ancak RIA'dan daha az hassastır ve deneysel işlemleri daha uzundur. Avantaj olarak radyoaktivite tehlikesi yoktur. Burada işaretli Ag'in hazırlanmasında işaretleyici olarak enzim kullanılır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra ortama bir substrat eklenerek spektrofotometrik olarak enzim aktivitesi ölçülür. Enzim aktivitesi ile tayin edilmek istenen madde arasındaki ilişkiden analitin konsantrasyonu ölçülür. ELISA yöntemi de melatonin ölçümünde sıklıkla kullanılmaktadır. Örneğin Venkataraman ve ark.ları yaptıkları çalışmada serum melatonin düzeylerini ELISA yöntemi ile ölçerken her bir örnek C18 SPE kolonlardan geçirilmiştir. Melatonin ölçümünde sensitivite 1,6 pg/mL olarak bulunmuş, sırasıyla gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlikleri 8,8– 151,7 pg/ml ve 5,6–134,3 pg/ml olarak bulunmuştur (119).

1.2.2.8.1.3. Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrofotometrisi (GC-MS): Bir karışımdaki gaz halinde bulunan veya kolayca buharlaştırılabilen bileşenlerin birbirinden ayrılması amacı ile kullanılan kromatografiye gaz kromatografisi denir. Hareketli faz helyum, argon gibi bir gazdır. Burada ölçülmek istenen analit gaz fazındadır. Gaz kromatografisinin kütle spektrometresi ile eşleştirilmesi sonucu ise GC-MS oluşturulur. Bu yöntemde ölçülebilir en düşük konsantrasyon 0,5 pg/mL'dir ve 200 pg/mL'ye kadar linearite devam etmektedir (120).

1.2.2.8.1.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC): Sıvı kromatografisi hareketli fazın sıvı, sabit fazın ise sıvı veya katı olduğu kromatografi çeşididir. Hareketli faz sabit fazın içinden geçtikçe çözünmüş moleküller iki faz arasında dağılır ve sabit faza daha az ilgisi olan çözünmüş yapılar daha çok ilgisi

olanlara oranla hareketli fazda uzun süre kalırlar. Sıvı kromatografide sabit faz küçük çaplı partiküllerden oluştuğunda ise yüksek basınçlı sıvı kromatografisi olarak adlandırılır. HPLC cihazı diğer sıvı kromatografisi cihazlardan kolon giriş ve çıkışı arasında oluşturulan yüksek basınç nedeni ile farklılık gösterir. HPLC’de ki başlıca ayırım mekanizmaları; iyon değiştirici, partision (normal veya ters faz), adsorbsiyon, afinite ve eleme prensiplerine dayalıdır. Rizzo ve ark.larının yaptıkları bir çalışmada, HPLC yöntemi ile plazma ve beyin omurilik sıvısında melatonin ölçümünde floresan dedektör, elektrokimyasal dedektör ile Extrasil ODS-2 analitik kolon ve mobil faz olarak da 25 mM sodyum asetat-asetonitril (72/28, v/v) (pH: 5) kullanılmıştır. Eksitasyon dalga boyu 275 nm, emisyon dalga boyu 345 nm, akım hızı 1 mL/dk dır. Melatonin ekstraksiyonu için 1mL örnek kapasiteli Chem-Elut hidromatriks ekstraksiyon kolonları kullanılmıştır. Sonuçlar eksternal standarda göre hesaplanmış ve çalışmanın sonucunda saptanabilir en düşük değer 0,5 pg/mL olup 500 pg/mL’ye kadar linearite devam etmiştir. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sırası ile % 3,24 ve 9,4 olarak bulunmuştur (121).

Römsing ve ark.larının yaptıkları çalışmada ise plazma melatonin ölçümünde floresan dedektör ile Waters Symmetry Shield RP18 analitik kolon ve mobil faz olarak da 0.01 M asetonitril-fosfat tamponu (25/25, v/v) (pH: 7,2) kullanılmıştır. Eksitasyon dalga boyu 285 nm, emisyon dalga boyu 345 nm, akım hızı 1 mL/dk dır. Melatonin ekstraksiyonu için 3 mL örnek kapasiteli Waters Oasis HLB SPE kolonları kullanılmıştır. Çalışmada eksternal standart ile internal standart (5-florotriptamin) da kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda saptanabilir en düşük değer 0,1 nmol/L olup 5,0 nmol/L’ye kadar linearite devam etmiştir. Gün içi tekrarlanabilirlik % 1,9 ile 13,2 günler arası tekrarlanabilirlik ise % 4,5 ile 18,1 bulunmuştur (122).

HPLC yöntemleri yeni solid faz ekstraksiyon yöntemi ile plazmadaki endogen interferansı elimine eden önde gelen bir metoddur. Diğer yöntemlere göre daha sensitif ve daha spesifiktir. Biz de bu nedenlerden dolayı melatonin düzeylerinin ölçümü için HPLC yöntemini tercih ettik.

1.2.2.8.2. Melatonin Sülfat Ölçüm Yöntemleri

Melatonin sülfat ise ELISA (123), HPLC (124), RIA (125) yöntemleri ile ölçülebilir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Grubu

GATA Göğüs Hastalıkları AD. Başkanlığınca 28.02.2008 - 03.11.2008 tarihleri arasında TB şüphesi ile yatırılan 43 hasta değerlendirildi. Bu hastalardan ARB (+) ve kültür (+) olup ilk kez TB tanısı alan 31 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların hepsi erkek ve ortalama yaşı $22,9 \pm 3,8$ yıl, yaş aralığı 20 – 32 yıl idi. Bilinen kronik bir enfeksiyonu ve sistemik hastalığı olmayan sağlıklı 31 erkek kontrol grubu olarak alındı. Kontrol grubunun ortalama yaşı $23,6 \pm 3,4$ yıl ve yaş aralığı 21–31 yıl idi.

Bu çalışma için GATA Etik Kurulu tarafından 22 Şubat 2008 tarih ve Y.ETİK KRL.:1491-532-08 sayılı etik kurul kararı ile amaç, yöntem ve yaklaşım bakımından etik ilkelere uygun olduğuna dair izin alınmıştır Çalışma ve kontrol grubunu oluşturan bireyler, kendilerine yöneltilecek sorular ve yapılacak işlemler konusunda bilgilendirilmiş ve tüm bireylerden “hasta onam belgesi” alınmıştır.

Çalışma ve kontrol grubunu oluşturan bütün bireylere yaş, cinsiyet, boy, kilo, sigara kullanımı, ilaç kullanımı, sistemik hastalık, uyku bozukluğu, dikkat eksikliği olup olmadığı ayrıca hasta grubuna TB tanısını ilk ne zaman aldığı, tanı sonrası tedavi alıp almadığı, yakınmaları ve süresi ile ilgili sorular yöneltmiştir. Elde edilen veriler ile bireylerin çalışmaya dahil edilip edilmeyeceklerine karar verilmiştir.

2.2. Örneklerin Toplanması ve Yapılan Ölçümler

2.2.1. Kan Örneklerinin Toplanması

Kontrol ve çalışma grubunu oluşturan bireylerden 8-10 saatlik açlığı takiben sabah 08⁰⁰ - 09⁰⁰ saatleri arasında rutin takip kanları ile birlikte 2 adet Etilen diamin tetraasetikasit (EDTA)'lı tüpe venöz kan alındı. Alınan kan örneklerini içeren tüpler, 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, serum ve plazmaları ayrıldı ve ayrılan plazmalar porsiyonlanarak çalışmaya kadar -80°C'de derin dondurucuda saklandı.

2.2.2. İdrar Örneklerinin Toplanması

24 saatlik idrar örnekleri toplandı, hacimleri ölçüldü ve 10 ml'lik idrar örnekleri porsiyonlanarak çalışmaya kadar -80°C'de derin dondurucuda saklandı. Bunun için hastalardan idrar toplanacağı günden 3 gün öncesinden başlayarak kafein ve alkol içeren içecekleri (çay, kahve, kola, enerji içecekleri, bira, alkol vs.) almamaları istendi. Hastalardan sabah ilk idrarlarını attıktan sonra ertesi gün sabahki

ilk idrarlarını da ekleyerek idrarlarını biriktirmeleri ve aynı gün getirmeleri istendi. Bu süreçte idrarlarını güneş ışığından koruyarak saklamaları istenildi.

Kan ve idrar örnekleri ışıktan etkilenebileceği için saklama anına kadar mümkün olduğu kadar ışıktan korundu. Alınan kan örneklerinden, plazma melatonin düzeyleri, serum glukoz, üre, kreatinin, ürik asit, SGOT, SGPT, total bilirubin, direk bilirubin, ALP, GGT, sodyum, potasyum, klor, kalsiyum, magnezyum, fosfor, total kolesterol, HDL-kolesterol, VLDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserit, demir, total demir bağlama kapasitesi, kortizol, DHEA-SO₄, sT₃, sT₄, TSH, CRP düzeyleri ve sedimantasyon, tam kan ölçümleri yapıldı. İdrar örneklerinden ise melatonin sülfat ölçümleri yapıldı.

Plazma melatonin düzeyleri GATA Tıbbi Biyokimya AD. HPLC Laboratuvarında HPLC yöntemi ile idrar 6-hidroksimelatonin sülfat düzeyleri ise ELİSA yöntemi kullanılarak ölçüldü.

Bireylerin tam kan ve rutin biyokimya analizleri GATA Merkez Biyokimya Hematoloji, Hormon ve Rutin Biyokimya Laboratuvarlarında, CRP ölçümü ise GATA Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında yapıldı.

2.3. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler

2.3.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı ve ekipmanları

- AGILENT (Almanya) (Şekil 11).
 - Dörtlü pompa (Hewlett packward 1050)
 - Degazır (Hewlett packward 1050)
 - Otomatik örnekleme sistemi (AGILENT 1200)
 - Floresan dedektör (AGILENT 1100)
 - Mikroişlemci CLASS VP V 6.14 SP1
 - Yazıcı (HP Laserjet 1018)



Şekil 11. HPLC cihazı AGILENT ve ekipmanları

2.3.2. Kolonlar

- Analitik kolon

C18 hidrokarbon zincirine bağlı silika içeren, partikül büyüklüğü 5 µm olan, 150 x 4.6 mm boyutlarında, 150 Å, ODS-2 ters faz kolon (Phemomenex İnertsil, ABD).

- Koruyucu kolon

Analitik kolon ile enjektör modülü arasına koruyucu olarak; C18 hidrokarbon zincirine bağlı silika içeren, partikül büyüklüğü 5 µm olan, 10x4.6 mm boyutlarında Waters Spherisorb ODS kartrij ve tutucusu

2.3.3. SPE kolonu (Waters Oasis HLB 1 cc cartridge, ABD)

2.3.4. Ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex RK 100, Almanya)

2.3.5. NANOpureUV Saf Su Cihazı (Milli-Q, Millipore, Fransa)

2.3.6. pH-metre (Mettler Toledo MP 220, İsviçre)

2.3.7 Santrifüj

- Soğutmasız santrifüj (Labofug 200 Heraeus, Almanya)

2.3.8. Hassas Terazı (Precisa, İsviçre)

- 2.3.9. Çeker ocak (Şimşek Labor Teknik, Türkiye)
- 2.3.10. Solvent Süzme Aparatı (Waters, Division of Millipore Milford, ABD)
- 2.3.11. Membran filtre 47 mm, 0,45 µ por çapında (Alltech, ABD)
- 2.3.12. Pipetler
- Otomatik Pipetler (Eppendorf, Almanya)
 - Cam pipetler
 - Pastör pipeti
- 2.3.13 Numune Süzme Filtresi
- PTFE, por büyüklüğü: 0,2 µm, çapı: 13 mm (Sigma-Aldrich, ABD)
- 2.3.14. Hamilton enjektör (Phemomenex, ABD)
- 2.3.15. Vorteks (NM 110, Türkiye)
- 2.3.16. Sodyum Asetat (Merck, Almanya)
- 2.3.17. Metanol HPLC Grade (Merck, Almanya)
- 2.3.18. Asetonitril HPLC Grade (Sigma-Aldrich, Almanya)
- 2.3.19. Diklorometan (Sigma-Aldrich, Almanya)
- 2.3.20. Asetik asit (BPH Limited Poole, İngiltere)
- 2.3.21. Melatonin (Sigma-Aldrich, M5250-106, Çin)
- 2.3.22. 5-florotriptamin (Sigma-Aldrich, F 7001, Almanya)
- 2.3.23. Eppendorf tüpü (1000, 1500 µl hacimlerinde)
- 2.3.24. Cam (10 ml) ve polietilen tüpler (5 ml)
- 2.3.25. Buz dolabı ve derin dondurucu (-80°C)
- 2.3.26. Melatonin Sulfate ELISA kiti (GenWay Biotech Inc. San Diego, CA, ABD)
- 2.3.27. ELİSA Okuyucu (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader)
- 2.3.28. ELx50 Microplate Strip Yıkayıcı (BioTek Instruments, GmbH, Bad Friedrichshall, Almanya)

2.4. Yöntemler

2.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması

2.4.1.1. Mobil Faz (75 mM sodyum asetat / asetonitril (72:28, v/v) (pH: 5).

75 mM sodyum asetat: 6,15 gr sodyum asetat 800 ml HPLC grade suda çözüldü ve hacim 1 lt'ye tamamlandı ve bundan 720 ml alındı. Asetonitril'den 280 ml alındı. Böylece son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Asetik asit ile pH: 5'e ayarlandı.

2.4.1.2. Melatonin Standartı (12,5; 25; 50; 100; 200 pg/mL)

1/9 (v/v) metanol/HPLC grade su karışımı ile 1nM konsantrasyonunda hazırlanan stok standart melatonin solüsyonları porsiyonlanarak -80°C'de saklandı. HPLC grade su ile dilüe edilerek 12,5; 25; 50; 100; 200 pg/mL'lık konsantrasyonlarda 5 adet standart hazırlandı.

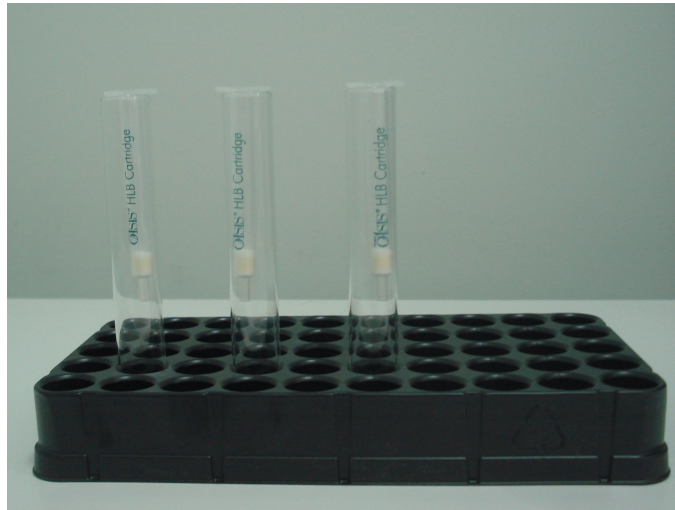
2.4.1.3. İnternal Standart (5-florotriptamin, 50 pM)

1/9 (v/v) metanol/HPLC grade su karışımı ile 1nM konsantrasyonunda stok internal standart hazırlandı ve posiyonlandı. Porsiyonlanan stok İnternal Standartlar -80°C'de derin dondurucuda saklandı. Çalışma sırasında günlük çıkarılıp 1/9 (v/v) metanol/ HPLC grade su ile dilüe edilerek hazırlanan 50 pM'lık konsantrasyondaki çalışma İnternal Standardı kullanıldı.

2.4.2. Örneklerin Hazırlanması

2.4.2.1.Solid Faz Ekstraksiyon Kolonlarının Hazırlanması

SPE kolonları daha iyi bir ayırıştırmanın sağlanması için kolonun hazırlanması amacı ile şartlandırıldı. Şartlandırmak için önce kolonlara 1 mL metanol, ardından da 1 mL HPLC grade su konularak 1 dk 1600 rpm'de santrifüj edilerek şartlandırıldı (Şekil.12).



Şekil12. SPE kolonlarının hazırlanması.

2.4.2.2. Plazma Melatonin Ölçümü İçin Örnek Hazırlanması

1 mL'lik eppendorf tüpü içerisine 800 µL plazma, 200 µL 50 pM konsantrasyonunda internal standart konuldu. Toplam 1000 µL'lik içerik 5-6 saniye vortekslendi. Daha önceden şartlandırılmış SPE ekstraksiyon kolonlarına uygulanan 1 ml'lik örnek 1 dk süreyle 1600 rpm'de santrifüj edilerek dışarı süzülür. Böylece ölçmek istediğimiz melatonin ekstraksiyon kolonunda tutulmuş oldu. Ekstraksiyon kolonunda tutulan melatonin, kolona 2 mL Diklorometan uygulanıp 1 dk 1600 rpm'de santrifüj edilerek ekstrakte edildi ve cam deney tüplerinde biriktirildi. Daha sonra bu cam tüpler içindeki Diklorometan sıcak su içinde çeker ocak altında benmari usulü uçuruldu. Üzerine 100 µL hacminde mobil faz eklenerek 30 saniye vortekslendi ve bundan 40 µL HPLC sistemine enjekte edildi.

2.5. Analiz

2.5.1. HPLC Sisteminin Özellikleri:

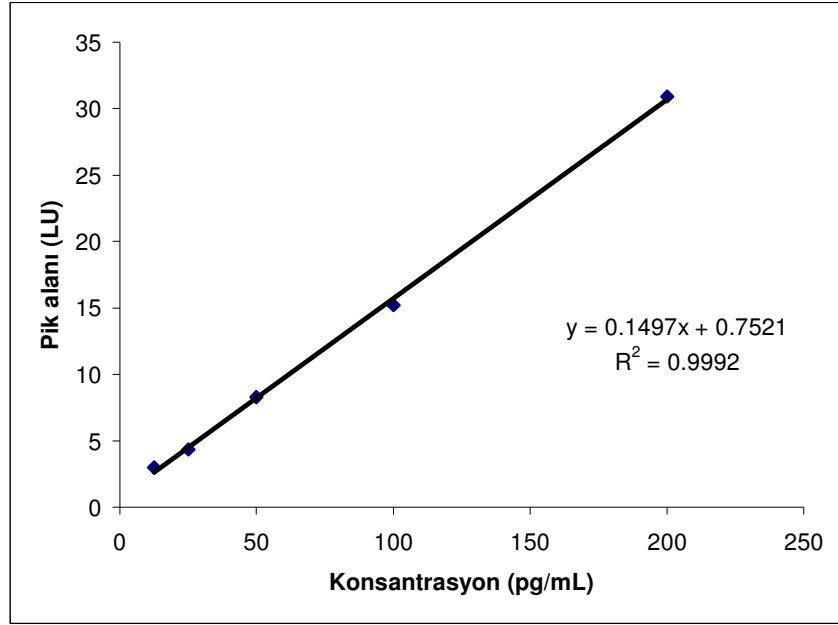
- a. Analitik Kolon: Phemenex İnertsil marka C18 5 µm partikül büyüklüğünde, 150 x 4,6 mm boyutlarında, 150 Å, ODS-2 ters faz (RP) kolon kullanıldı.
- b. Koruyucu Kolon: Waters Spherisorb ODS, partikül büyüklüğü 5µ, 10x4,6 mm kartrij ve tutucusu kullanıldı.
- c. Mobil Faz: 75 mM sodyum asetat+asetonitril (72:28, v/v) (pH: 5), izokratik çalışma.
- d. Akım hızı: 1 mL /dakika.
- e. Enjeksiyon hacmi: 40 µL
- f. Floresan dedektör (FLD): Eksitasyon dalga boyu: 275 nm, Emisyon dalga boyu: 345 nm.
- g. Çalışma süresi: 10 dakika.
- h. Kalibrasyon: Eksternal standart kullanıldı.

2.5.2. Melatonin Eksternal Standart Çözeltisi İle Kalibrasyon

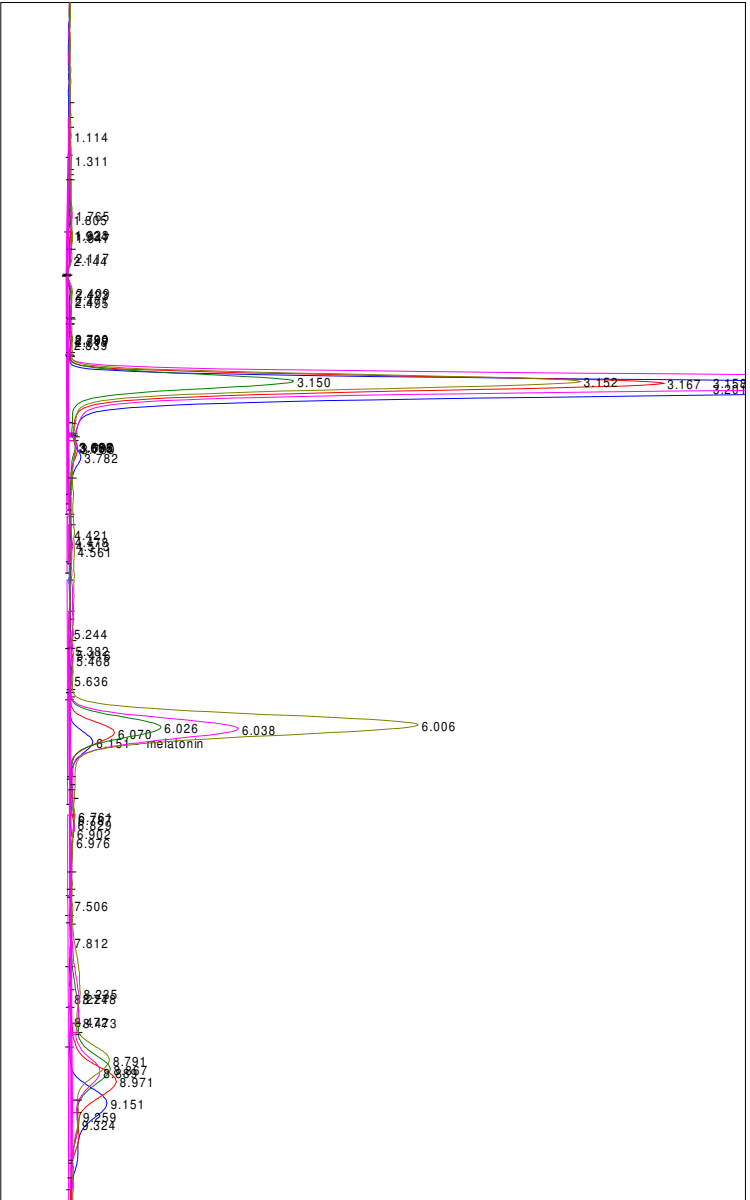
1/9 (v/v) metanol-HPLC grade su karışımı ile 1nM konsantrasyonunda hazırlanıp -80°C'de derin dondurucuda saklanan stok standart melatonin solüsyonları çalışma günü sabahı derin dondurucudan çıkarıldı. HPLC grade su ile dilüe edilerek hazırlanan 12,5; 25; 50; 100; 200; pg/mL konsantrasyonlarındaki melatonin standartları HPLC sistemine enjekte edildi. Elde edilen pik alanları esas alınarak

regresyon analizi yapıldı ve melatonin standart kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 13). Elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak bilinmeyen örneklere ait kromotogramlardan melatonin konsantrasyonları bulundu.

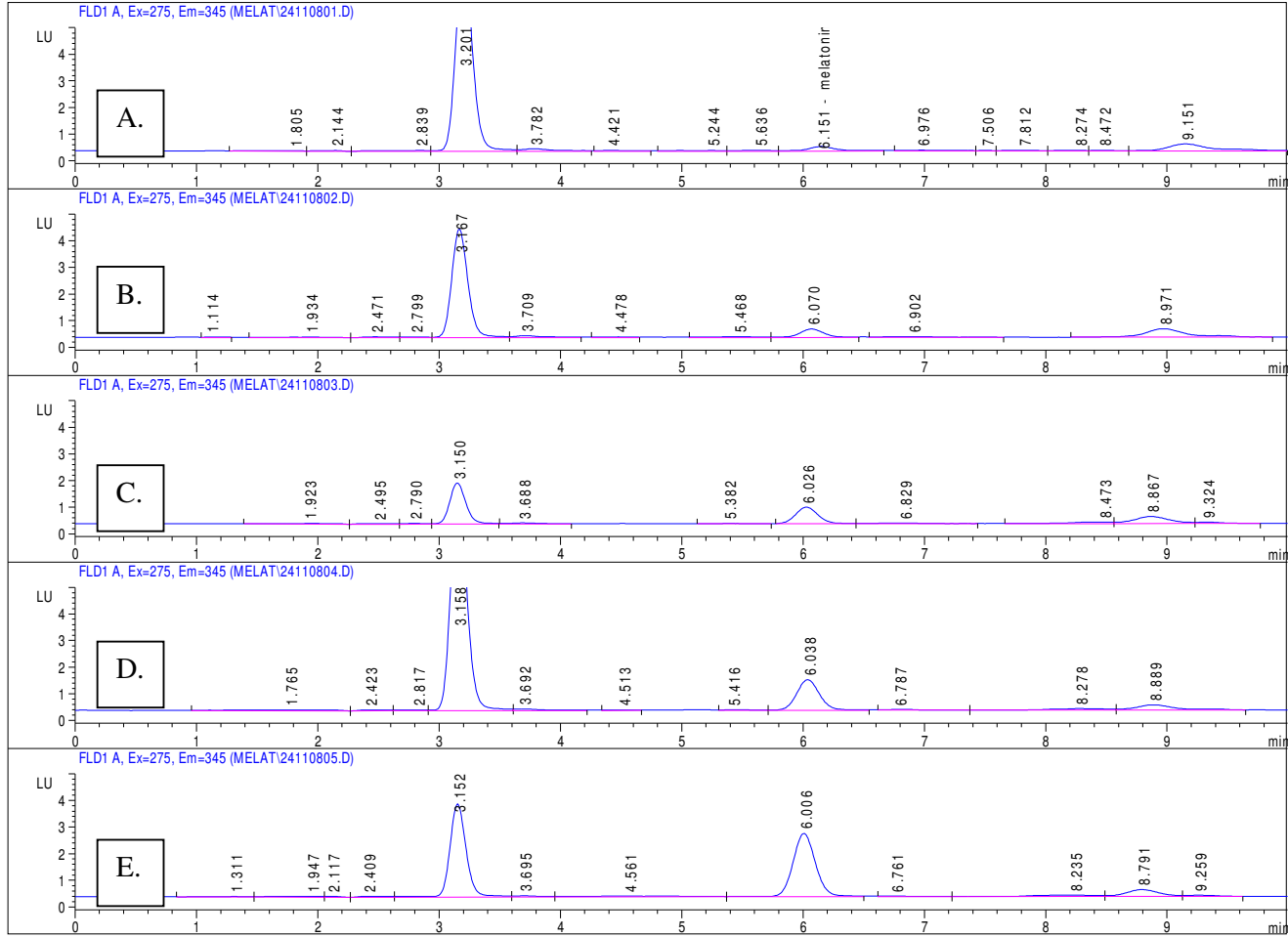
Melatonin Standart Grafiği



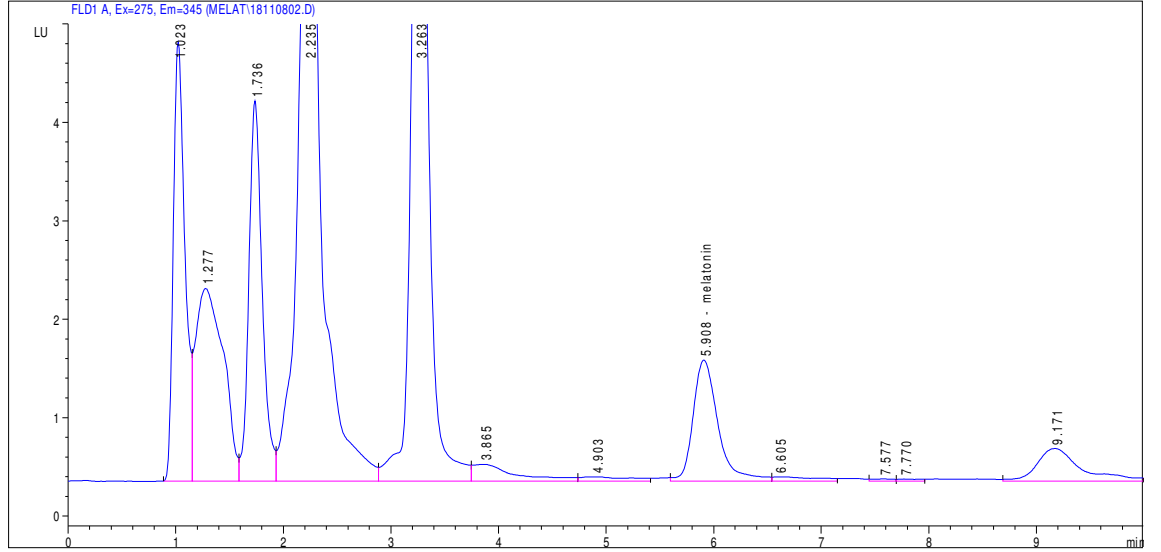
Şekil 13. Melatonin standart eğrisi.



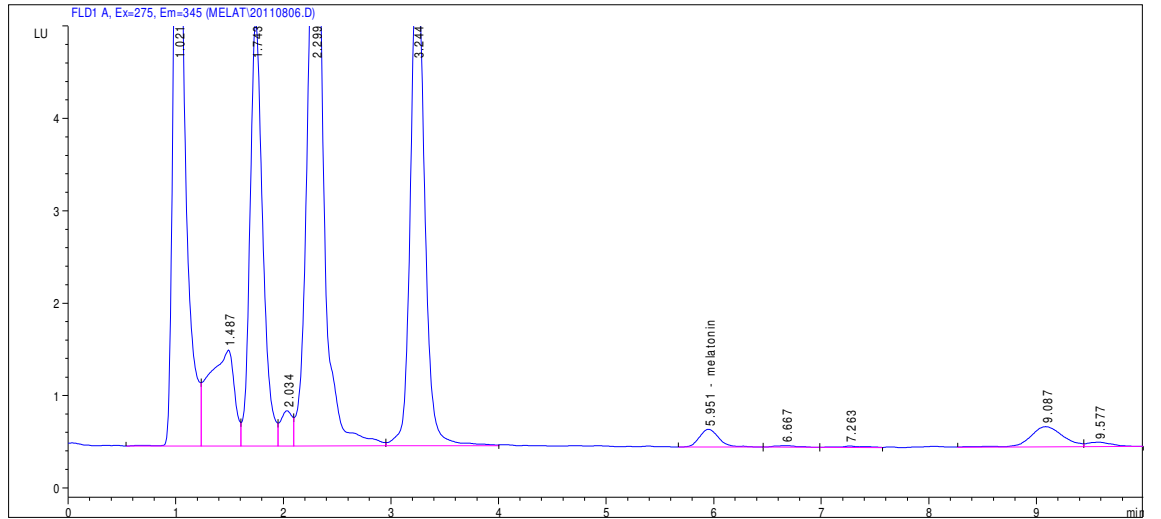
Şekil 14. 12,5; 25; 50; 100; 200 pg/mL konsantrasyonlara sahip Melatonin Standartlarına ait Kromatogramların üst üste konularak elde edildiği grafik.



Şekil 15. A:12,5 B:25 C:50 D:100 E:200 pg/mL melatoninin standartlarına ait kromatogramlar.



Şekil 16. Sağlıklı bir bireye ait plazma melatonin kromatogramı. Bu örnekte melatonin konsantrasyonu 127,05 pg/mL dır. Pik çıkış zamanı (Retantion time=RT) 5,908 dakikadır.



Şekil 17. Tüberkülozlu bir bireye ait plazma melatonin kromatogramı. Bu örnekte melatonin konsantrasyonu 12,85 pg/mL dır. RT 5,951 dakikadır.

2.5.3. Yöntem Validasyonu

2.5.3.1. Melatonin Ölçümü İçin Gün İçi (Intra-assay) Tekrarlanabilirlik

Gün içi tekrarlanabilirlik için sekiz hastadan kan alınarak (EDTA'lı tüpe) hazırlanan plazma havuzu kullanıldı. Örnekler melatonin örnek hazırlama prosedürüne göre hazırlanarak aynı gün içerisinde toplam 10 kez melatonin çalışıldı. Gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları ve yüzde değişkenlik katsayısı (% CV) Tablo 1'de gösterilmiştir.

2.5.3.2. Melatonin Ölçümü İçin Günler Arası (Inter-assay) Tekrarlanabilirlik

Günler arası tekrarlanabilirlik için sekiz hastadan kan alınarak (EDTA'lı tüpe) hazırlanan plazma havuzu kullanıldı. On gün tekrarlanacak şekilde; melatonin örnek hazırlama prosedürüne göre hazırlanan örnekler, -80 °C'de derin dondurucuda çalışma zamanına kadar saklandı. Hazırlanan örnekler 10 gün boyunca günlük olarak her gün bir örnek -80 °C'deki derin dondurucudan çıkarıldı ve melatonin ölçümleri yapıldı. Günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları ve % CV Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1 . Melatonin ölçümü için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları.

Gün İçi Tekrarlanabilirlik			Günler Arası Tekrarlanabilirlik		
Ölçüm No	Melatonin konsantrasyonu (pg/mL)	% CV	Gün	Melatonin konsantrasyonu (pg/mL)	% CV
1	96,29	4,02	1.gün	90,12	5,41
2	94,85		2.gün	88,44	
3	94,56		3.gün	92,88	
4	93,90		4.gün	90,92	
5	96,05		5.gün	97,89	
6	96,58		6.gün	83,93	
7	84,22		7.gün	97,20	
8	89,86		8.gün	85,04	
9	94,30		9.gün	88,04	
10	94,30		10.gün	96,29	
Ortalama	93,49		Ortalama	91,07	
S.S.	3,76		S.S.	4,93	

% CV= Coefficient of Variation (yüzde değişkenlik katsayısı); SS= Standart Sapma

2.5.3.3. Melatonin Ölçümü İçin Geri Elde (Recovery)

Aşağıdaki formülle geri elde hesaplaması yapıldı.

$$\% \text{ Geri Elde} = \text{Geri Elde Konsantrasyon} / \text{Eklenen Konsantrasyon} \times 100$$

$$\text{Geri elde Kons.} = \text{Ölçülen kons.} - \text{Bazal kons.}$$

Bazal Konsantrasyon hesaplaması için; melatonin konsantrasyonu (37,4 pg/mL) ölçülen örnekten 0,25 ml alınıp, üzerine 0,25 ml distile su eklendi.

$$\text{Bazal Kons.} = 37,4 / 2 = 18,7 \text{ pg/mL}$$

Eklenen Konsantrasyon hesaplaması için; melatonin konsantrasyonu (100 pg/mL) ölçülen standarttan 0,25 ml alınıp, üzerine 0,25 ml distile su eklendi.

$$\text{Eklenen Kons.} = 100 / 2 = 50 \text{ pg/mL}$$

Daha sonra Bazal Konsantrasyon örneğinden 0,25 ml alıp, bunun üzerine 0,25 ml Eklenen Konsantrasyon örneğinden eklendi. Daha sonra bu karışımın konsantrasyonu ölçüldü. Bu ölçüm 67,3 pg/mL olarak bulundu.

$$\text{Geri Elde Kons.} = 67,3 - 18,7 = 48,6$$

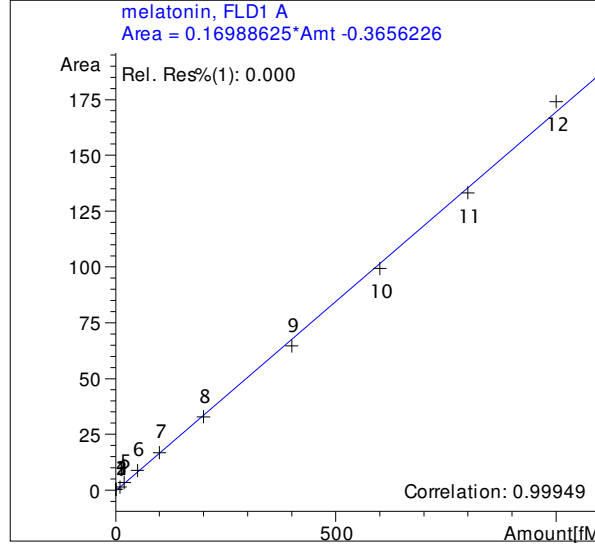
$$\% \text{ Geri Elde} = 48,6 / 50 \times 100 = \% 97,2$$

Buradan % Geri Elde hesaplandı ve % 97,2 olarak bulundu.

2.5.3.4. Linearite

Melatonin stok standardı dilüe edilip 0,25; 0,5; 1; 10; 20; 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000 pg/mL değerlerinde standartlar hazırlandı. Bu değerlerde linearitenin devam ettiği tespit edildi (Şekil 18).

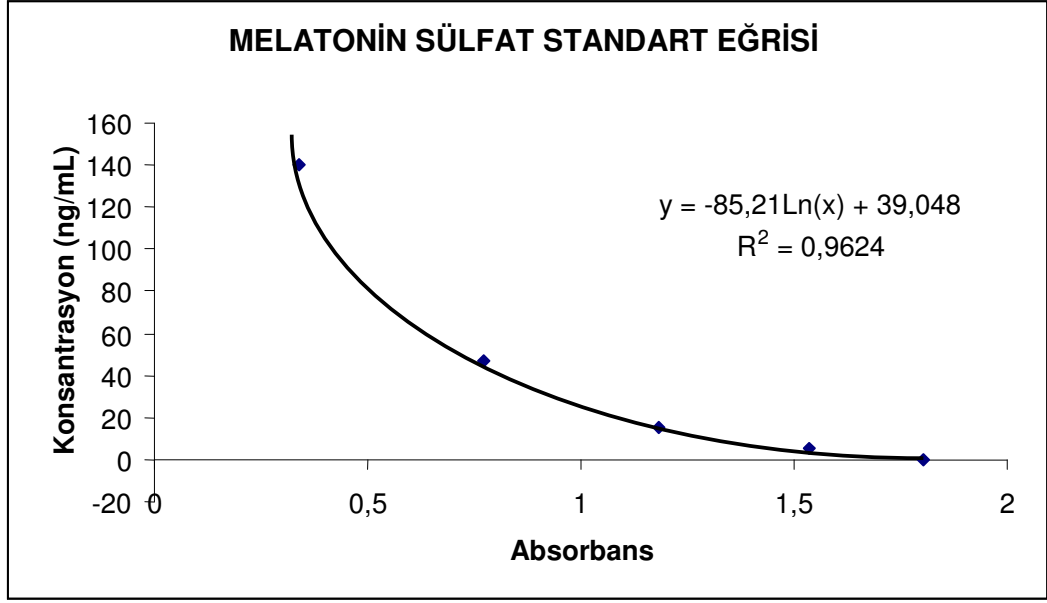
Linearite Grafiği



Şekil 18. 0,25; 0,5; 1; 10; 20; 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000 pg/mL konsantrasyonlarına sahip melatonin Standartları kullanılarak elde edilen linearite grafiği.

2.5.4. İdrar Melatonin Sülfat Düzeylerinin Ölçümü

İdrar Melatonin Sülfat ölçümleri için, Melatonin Sulfate ELISA kiti (GenWay Biotech Inc. San Diego, CA, A.B.D) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar Synergy HT Multi-Mode Microplate ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm'de okutuldu. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak ELx50 Microplate Strip yıkayıcı kullanıldı. Sonuçlar µg/24 saat olarak verildi. Bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları, melatonin sülfat regresyon analiz grafiğinden elde edilen formül ile hesaplandı. Saptanabilir en düşük değer 1 ng/mL iken linearite değeri 250 ng/mL idi. Ölçümlere ait gün içi tekrarlanabilirlik değeri (% CV): % 5,2 - 12,2 ve günler arası tekrarlanabilirlik değeri (% CV): % 5,1 - 14,9 idi. Melatonin sülfat standartlarına ait regresyon analiz grafiği Şekil 19'da görülmektedir.



Şekil 19. Melatonin Sülfat standartlarına ait regresyon analiz grafiği

2.5.6. Diğer Laboratuvar Parametrelerinin Ölçümü

Tam kan: ABX Pentra DX 120 ile çalışıldı.

Sedimentasyon: SRS 100 ile çalışıldı.

Rutinler: Rutinler (Kalsiyum, üre v.s.) Olympus AU 2700 otomalizörü, Hamburg, Almanya ile çalışıldı

Hormonlar: Modular Analytics E 170 Module, Roche Diagnostics, Indianapolis, ABD ile çalışıldı.

2.5.7. İstatistiksel Analiz

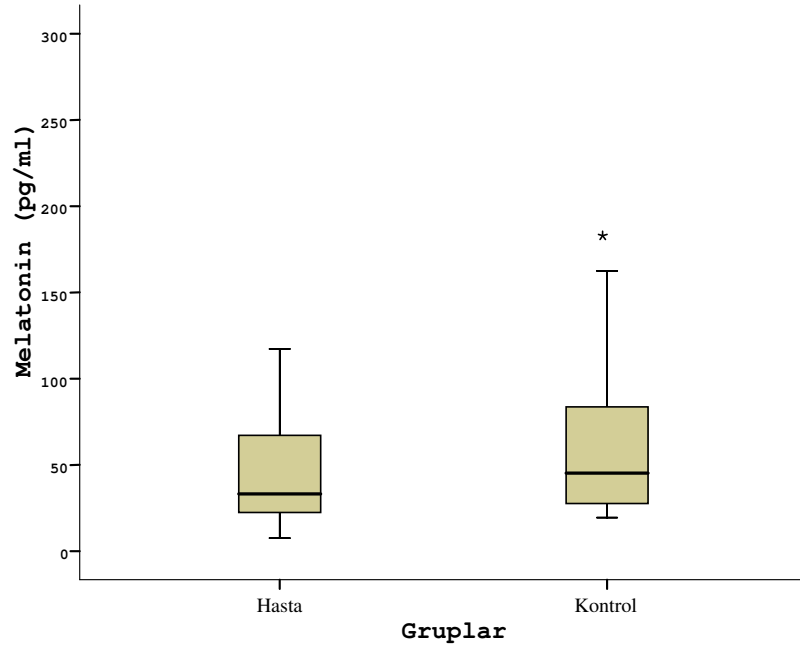
Veriler bilgisayar ortamına aktarıldı ve SPSS v 11,5 for Windows (Chi., Il., ABD) paket programı ile istatistiksel değerlendirme yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama \pm standart sapma, ortanca (en küçük-en yüksek) olarak verildi. Gruplar arası karşılaştırmada değişkenlere ait dağılım özellikleri dikkate alınarak bağımsız gruplara t Testi veya Mann Whitney U testi kullanıldı. Değişkenler arası doğrusal ilişki (korelasyon) varlığının değerlendirilmesinde Spearman Rho korelasyon testi kullanıldı. P değerinin 0,05'den küçük olduğu durumlarda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğuna karar verildi.

3.BULGULAR

İlk kez tüberküloz tanısı almış 31 kişi hasta grubu olarak ve 31 sağlıklı kişi de kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta grubunda yaş ortalaması $22,9 \pm 3,8$ yıl iken kontrol grubunda $23,6 \pm 3,4$ yıl idi. Hasta ve kontrol gruplarındaki tüm bireyler erkekti. Her iki grupta yaş ve cinsiyet dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak hasta grubundaki vücut kitle indeksi (VKİ) değerleri ($21,1 \pm 2,3$), kontrol grubuna ($24,1 \pm 2,7$) göre daha düşüktü ($p < 0,001$).

3.1. Plazma Melatonin Düzeyleri

Hasta grubunda plazma melatonin düzeyleri $33,17$ ($7,52-163,41$) pg/mL iken kontrol grubunda $45,20$ ($19,27-288,99$) pg/mL olarak bulundu. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ($p = 0,037$) (Şekil 20).

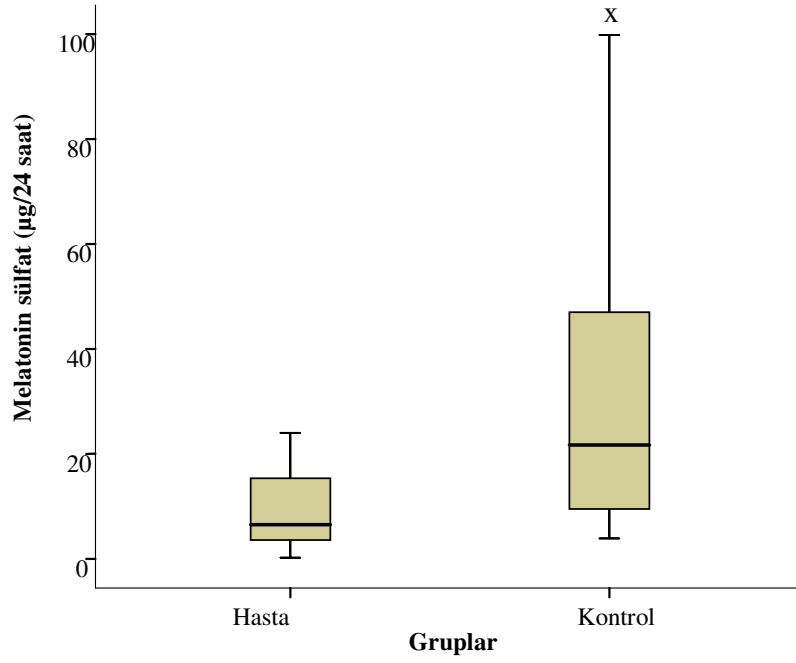


Şekil 20. Hasta ve kontrol gruplarında plazma melatonin düzeyleri.

*: istatiksels olarak anlamlı ($p < 0,05$).

3.2. İdrar Melatonin Sülfat Düzeyleri

Hasta grubunda İdrar melatonin sülfat düzeyleri $6,5$ ($0,2-34,8$) $\mu\text{g}/24$ saat iken kontrol grubunda $21,7$ ($3,9-99,8$) $\mu\text{g}/24$ saat olarak bulundu. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ($p < 0,001$) (Şekil 21).



Şekil 21. Hasta ve kontrol gruplarında idrar melatonin sülfat düzeyleri.

*: istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$).

3.3. Diğer Laboratuvar Parametrelerinin Düzeyleri

Hasta grubunda, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sedimantasyon, kortizol, lökosit, CRP ve platelet değerleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (Tablo 2).

Hasta grubunda sT_3 , Hb, albumin ve DHEA- SO_4 düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (Tablo 2).

sT_4 ve TSH değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 2).

Tablo 2. Hasta ve kontrol gruplarına ait laboratuvar sonuçları.

Değişkenler	Hasta grubu (n=31)	Kontrol grubu (n=31)	P değeri
Plazma Melatonin (pg/mL) ^a	33,17 (7,52 – 163,41)	45,20 (19,27 – 288,99)	0,037
İdrar Melatonin Sülfat (µg/24saat) ^a	6,5 (0,2 – 34,8)	21,7 (3,9 – 99,8)	<0,001
sT ₄ (ng/dL) ^b	1,32 ± 0,23	1,34 ± 0,16	0,696
sT ₃ (pg/mL) ^b	2,94 ± 0,66	3,50 ± 0,39	<0,001
TSH (µIU/mL) ^a	2,13 (0,26 – 4,43)	1,46 (0,55 – 3,26)	0,055
Kortizol (µg/dL) ^b	18,89 ± 3,97	13,89 ± 3,2	<0,001
DHEA-SO ₄ (µg/dL) ^a	185 (41,6 – 519,7)	299,2 (151 – 777)	<0,001
Hb (g/dL) ^b	13,59 ± 1,64	15,56 ± 0,62	<0,001
Lökosit (x10 ³ /µL) ^b	7,91 ± 1,98	6,26 ± 1,25	<0,001
Platelet (x10 ³ /µL) ^a	280 (164 – 481)	223 (147 – 346)	0,004
Albumin (g/dL) ^b	3,93 ± 0,59	4,58 ± 0,22	<0,001
Sedimantasyon (mm/saat) ^a	30 (2 – 95)	2 (1 – 12)	<0,001
CRP (mg/L) ^a	28,2 (2,92 – 134,2)	3,21 (1 – 8,1)	<0,001

^a Değerler ortanca değer (en düşük- en yüksek) olarak ifade edilmiştir:

^b Değerler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

3.4. Değişkenler Arası Doğrusal İlişki (korelasyon) Varlığının Değerlendirilmesi

Melatonin ile melatonin sülfat, sT₄, sT₃, TSH, kortizol, DHEA-SO₄, Hb, lökosit, platelet, albumin, sedimantasyon, CRP parametreleri açısından ve melatonin sülfat ile sT₄, sT₃, TSH, kortizol, DHEA-SO₄, Hb, lökosit, platelet, albumin, sedimantasyon, CRP parametreleri açısından her iki grupta doğrusal ilişki olup olmadığı incelendiğinde; hasta grubunda melatonin sülfat ile kortizol değerleri arasında negatif bir korelasyon (r=-0,482; p=0,006) ve melatonin sülfat ile DHEA-SO₄ konsantrasyonları arasında negatif bir korelasyon (r=-0,353; p=0,049) bulundu. Diğer parametreler arasında her hangi bir ilişki bulunamadı.

4.TARTIŞMA

Günümüzde melatonin ölçümünde kullanılan yöntemler RIA, ELISA, GC-MS ve HPLC'dir. En sıklıkla kullanılan yöntemler ise hazır kitlerin kullanıldığı RIA, ELISA gibi immünoassay yöntemlerdir (122). Bu immünoassay yöntemlerinde melatonin molekülü diğer benzer indol yapılı bileşikler ile çapraz reaksiyon verdiği için bu yöntemlerin selektivitesi daha düşüktür. GC-MS metodu ise hem sensitif hem de selektif bir metoddur ancak kullanılan malzemelerin pahalı oluşu kullanımını sınırlamaktadır. Aynı zamanda bileşiklerin türevlerini saptamak için örnek hazırlama süresi uzundur ve doğru kantitatif değerlendirme için özel internal standartlara ihtiyaç olduğundan dolayı pahalı bir yöntem olması nedeniyle pek tercih edilmemektedir (126).

Melatoninin kendisi doğal olarak yüksek floresans özellik gösteren bir moleküldür. Numunedeki melatoninini selektif olarak ayırmak için kullanılan SPE kolonları, yüksek konsantrasyonda dahi endojen indol bileşiklerden melatoninin ayrılmasında uygundur (127).

Melatoninle ilgili yapılmış olan çalışmalar ve kullanılan yöntemlere bakıldığında; melatonin ölçümünde en önemli kısmı, numune içerisinde melatoninin ayrıştırılması oluşturmaktadır. Bu nedenle bizim kullandığımız HPLC yönteminde örnek hazırlama aşamasında kullanılan SPE kolonları ile ayrılma işlemi, plazmadaki endojen indol bileşiklerinin interferansını en aza indirecek önde gelen bir metoddur. Bunun yanı sıra iyi bir ayrıştırma yapıldıktan sonra ölçüm için kullanılacak olan yöntem de büyük önem arz etmektedir. Yapılan araştırmalarda hem kolay hem de ucuz ve hızlı olması nedeniyle en çok tercih edilen yöntemler RIA ve ELISA'dır. Ancak bilindiği gibi immünoassayler ile ilgili olarak elde edilen verileri ışığında; gün içi, günler arası tekrarlanabilirliklerin ve geri kazanım sonuçları kromatografik yöntemler elde edilenlere göre daha yüksek değerlere sahip olduğu bilinmektedir. Venkataraman ve ark.larının serum melatonin düzeylerini ELISA yöntemi ile ölçtükleri çalışmada. gün içi, günler arası tekrarlanabilirlikleri sırasıyla 8,8– 151,7 pg/mL ve 5,6–134,3 pg/mL olarak bildirilmiştir (119). Bu gibi nedenlerden dolayı biz melatonin ölçümünde daha az tercih edilmesine rağmen altın standart ve referans yöntem olarak kabul edilen HPLC yöntemini kullandık. Elde ettiğimiz

verilerden gün içi, günler arası tekrarlanabilirliklerin ve geri kazanım sonuçlarının çok iyi olduğunu gözlemledik.

Yapılan çalışmalara bakıldığında serum, plazma, tükürük, idrar, çeşitli doku örneklerinde melatonin konsantrasyonlarının ölçüldüğü görülmektedir. (121, 122, 128). Ancak daha yaygın olarak plazma örnekleri kullanılmaktadır. Biz ön çalışma olarak hem serum hem de plazmadaki melatonin seviyelerine baktık. Sonuç olarak serum ve plazma seviyelerinin hem birbirine yakın değerlerde olması ve RT'nın aynı sürelerde olması nedeniyle, sonraki çalışmalarımızda örnek olarak plazma örneklerini kullandık. Melatoninin diürenal ritminden dolayı plazma melatonin ölçümleri ile 24 saatlik idrar örneklerinde metaboliti olan melatonin sülfatın ölçümünü de yaptık. Hasta grubunda melatonin sülfat düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük bulundu. Ancak her iki gruptaki plazma melatonin düzeyleri ile idrar melatonin sülfat düzeyleri arasında beklediğimiz korelasyonu bulamadık. Bunun nedeni olarak da melatonin sülfat düzeylerini ölçmek için kullanılan ELISA yönteminden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

HPLC çalışmalarına başlamadan önce internal ve eksternal standartı birlikte kullanmaya karar verdik. Bu maksatla melatonine moleküler yapı bakımından benzerlik gösteren çeşitli internal standartlar kullanılmaktadır. Biz çalışmamızda internal standart olarak 5-florotriptamin'i (Sigma-Aldrich, F 7001) ve eksternal standart olarak melatonin'i (Sigma-Aldrich, M5250-106) kullandık. Tüm çalışma örneklerine eşit miktarlarda internal standart kattığımızda kromatogramlarda 3,2 dakikada internal standarda ait pik görüldü. Ancak çalışma örneklerine eklenen internal standarda ait piklerin alanlarının ve yüksekliklerinin Römsing ve ark.larının yaptıkları çalışmadaki sonuçların (122) aksine, beklenildiği gibi eşit pik alanları ve pik yüksekliklerini elde edemedik. Bu da bize 5-florotriptamin'in molekül yapısının, örnek hazırlama sırasında kullandığımız SPE kolonlarında ekstraksiyon sırasında tam olarak ayrılmadığı ve bu nedenle her numunede farklı pik alan ve yüksekliklerine sahip olduğunu gösterdi. İnternal standarda ait bu sıkıntılardan dolayı hesaplamalarımızda internal standartı kullanmayıp sadece eksternal standarta göre yaptık. Ayrıca Römsing ve ark.larının çalışmalarında (122) belirtildiği gibi ilk önce internal standartı distile su ile çözdürerek hazırlamaya çalıştık ancak çözülmediğini

görünce 1/9 (v/v) metanol/ distile su ile stok internal standartları hazırlayıp daha sonraki dilüsyonları da 1/9 (v/v) metanol/ distile su ile yaptık.

Römsing ve ark.larının yaptıkları çalışmada 1,0 mmol/L'lik stok eksternal melatonin standardı hazırlanıp bundan 100, 75 ve 25 nmol/L'lik çalışma standartları hazırlanmıştır (122). Rizzo ve ark.larının yaptıkları çalışmada (121) ise 1 mg/mL'lik stok eksternal melatonin standardı hazırlanıp bunun dilüsyonu ile 0,5–500 pg/mL arasında standartlar hazırlanmış. Biz ise 1 nmol/ L'lik stok melatonin standardı hazırlayıp bunun dilüsyonu ile 12,5; 25; 50; 100; 200 pg/mL'lik çalışma standartları hazırladık. Çünkü insanlardaki normal serum melatonin düzeyleri; gündüz 10-20 pg/mL iken gece 80-150 pg/mL düzeylerindedir. Hazırladığımız bu melatonin standartları ile standart eğrisi çizdirdik. Ayrıca çok düşük ve çok yüksek değerlerde (0,25-1000 pg/mL arasında) standartlar hazırlayıp linearitenin bozulmadığını çok geniş bir aralıkta dahi linearitenin devam ettiğini gördük. Melatonin ölçümü için gün içi (n=10) ve günler arası (n=10) tekrarlanabilirlik sonuçları sırasıyla % CV= 4,02; % CV= 5,41 olarak bulundu. Bu metodla sadece 0,8 mL'lik plazma örnekleri ile çok geniş aralıklardaki melatonin seviyesinin güvenilir bir şekilde ölçülebilmesi bir avantajdır. Aynı zamanda hem örnek hazırlama hem de ekstraksiyon işleminin basit olması ve çalışma süresinin 10 dakika gibi kısa bir süre olması da çalışmanın bizlere sağladığı büyük avantajlardandır.

Son yıllarda tekrar yaygınlığı artmakta olan ve her yıl 7,5 milyon yeni vakanın eklendiği TB, büyük bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (1). Tanı ve tedavisinde önemli mesafeler alınmış olmasına rağmen, halen tüberküloz hastalığının kontrol altına alınmasında rol oynayan immuno-endokrin sistem tam olarak ortaya konulamamıştır. Ancak TB, hücrel immün yanıt ile kontrol edilebilen bir hücre içi enfeksiyonudur ve konağın TB enfeksiyonunu kontrol etme yeteneği, etkin bir hücrel immün cevap oluşturmasına bağlıdır. Hücrel immünite; makrofaj, dentritik hücre, sitokin ve T lenfosit ile sağlanır. Hücrel immüntenin spesifitesi, primer olarak makrofaja değil, T lenfositlerine bağlıdır (24). Bu sistem içerisinde T lenfositleri ve hipotalamo-pituiter-adrenal aks etkin olmakla beraber; bu mekanizmada melatoninin etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. Ancak fizyolojik olarak melatoninin immüniteyi artırıcı etkileri yaklaşık 30 yıldır bilinmektedir ve immün sistem üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar ile immünmodülatör etkisi

ortaya konulmuştur. Bu etkinin Th1 hücreleri tarafından salınan sitokinlerle ilişkili olduğu ve melatonin verilmesinin Th1 üretimini desteklediği gösterilmiştir (6). Yine melatoninin Th (CD4⁺) lenfositlerinin sayısını artırdığı gibi, monosit (CD14⁺/CD4⁺) ve T hücre aktivitelerini artırarak; NK hücre aktivitesini artırdığı, granülosit ve makrofajlar için öncül hücrelerin (GM-CFU) üretimini uyardığı gösterilmiştir (33, 62, 63). Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ışığında, immün sistem üzerindeki etkinliğini özellikle hücrel immünite aracılığı ile gösteren plazma melatonin düzeyleri ile TB aktivasyonu ve enfeksiyonun tedavisi arasında ilişki olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak bugüne kadar yapılmış olan yayınlar incelendiğinde; TB ve melatonin arasındaki bu ilişkiyi gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Biz de bu çalışmamızda, TB ile melatonin arasında ilişki olup olmadığını göstermeyi amaçladık. Bu maksatla plazma melatonin düzeylerinin ölçümünde kullanılacak en hassas ve altın standart olarak da kabul edilen referans bir yöntem olan, HPLC metodunun laboratuvarımızda rutin olarak kullanıma girmesini sağladık.

Literatürde TB enfeksiyonu ile hücrel immüniteyi ilişkilendiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu konuda Dunlop ve ark.larının yaptıkları çalışmada, CD4⁺ T hücrelerinden yoksun bırakılan farelerin TB enfeksiyonunu kontrol yeteneklerini kayb ettikleri ve basil sayılarının giderek arttığı gösterilmiştir. Böylece TB enfeksiyonu ile T hücreleri arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuşlardır (129). Benzer şekilde Winslow ve ark.ları farelerde TB immünitesinde, CD4⁺ T hücrelerinin erken dönemde aktive olduğunu ve hastalığın kontrolünde bu aktivasyonun büyük bir öneme sahip olduğunu bildirmişlerdir (130). Tüberkülozun, kronik persistan patojen ve immün cevap potansiyeli arasındaki karşılıklı etkileşim neticesinde ortaya çıktığı ve bu mekanizmada T hücreleri ve sitokinlerin (IL-12p40, IL-23 ve IL-27 gibi) birincil rol oynadığı Cooper ve ark.ları tarafından bildirilmiştir (131). Liote'nin yapmış olduğu bir çalışmada, immüsupresif ilaçların kullanılmasının hastalarda tüberkülozun ortaya çıkmasına neden olduğunu bildirilmektedir (132). Diğer taraftan bazı ulusal veri tabanlarında (ABD, İspanya) immüsupresif ilaç kullanan hastalarda (özellikle steroid kullanan romatoid artritli hastalar) tüberküloz oranının arttığı rapor edilmiştir (132).

Tüm bu çalışmalar TB enfeksiyonunun ortaya çıkması ve tedavisinde immün sistemin, özellikle de hücrel immün sistemin önemini göstermektedir. Biz de

çalışmamızda immün modulator bir molekül olduğu kabul edilen melatonin'in plazma düzeylerinin, ilk kez TB tanısı alan hastalarda sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük olduğunu gösterdik. Yine bu sonuçla uyumlu olarak TB grubunda melatoninin bir metaboliti olan idrar melatonin sülfat düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük olduğunu gösterdik. Yani değişik nedenlerle immün sistemin zayıf olduğunu düşündüğümüz tüberkülozlu hasta grubunda, immün sistemi normal olan sağlıklı gruba göre melatonin ve melatonin sülfat düzeyleri beklediğimiz gibi belirgin olarak daha düşük bulunmuştur.

Literatürde melatoninin organizmanın enfeksiyona cevapta oynadığı rolle ilgili çalışmalar da mevcuttur. Bunlardan birinde Santello ve ark.ları, *Trypanosoma cruzi* enfeksiyonu oluşturdukları ratlarda melatoninin immün sistemi düzenleyici etkisini araştırmak için; enfeksiyondan önce ve enfeksiyon oluşturduktan sonra ratlara oral melatonin vermişler. Tedavi verilmeyen ratlara göre Th-1, IL-4 ve 10, TGF β -1 proliferasyonu olduğunu göstermişler ve sonuç olarak melatoninin *Trypanosoma cruzi* enfeksiyonunun tedavisinde immün düzenleyici bir etkiye sahip olduğu sonucuna varmışlardır (133). Santello ve ark.ları da benzer şekilde *Trypanosoma cruzi* enfeksiyonunda melatoninin immün düzenleyici etkisini TNF- α , INF- γ , IL-12, Nitrik oksid (NO) ve makrofaj sayısı ile değerlendirmişlerdir. Çalışmada enfeksiyon sonrası melatonin başladıkları grupta, enfeksiyondan bir hafta önce başladıkları gruba göre daha iyi sonuç aldıklarını ve melatoninin asıl immün düzenleyici etkisini Th1 üzerinden gösterdiğini bildirmişlerdir (134). İmamoğlu ve ark.ları piyelonefrit oluşturdukları ratlarda antibiyotik ve melatonin kombinasyonu verdikleri grupta, melatoninin malondialdehit üretimi ve nötrofil infiltrasyonunu engellediğini ve böylece böbreği hasarlanmaktan ve skar oluşumundan koruduğunu bildirmişlerdir. (135). Yavuz ve ark.ları da kandida sepsisi oluşturdukları ratlarda melatonin enjeksiyonu yaptıkları grupta, melatoninin immün düzenleyici etkisi nedeni ile kandida tedavisine melatonin verilmeyen gruba göre daha iyi sonuç aldıklarını göstermişlerdir (136). Bu çalışmalar da göstermektedir ki; melatonin özellikle Th1 hücreler ve sitokinler üzerinden hücrel immünitinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle yine hücrel immün yanıt ile kontrol edilebilen bir hücre içi enfeksiyon olan TB enfeksiyonu ile ilgili immünitenede melatonin bir

rolünün olabileceği düşünülmektedir. Düşük plazma melatonin ve idrar melatonin sülfat düzeylerinin, immün sistemde bir zayıflamaya neden olduğu ve bu nedenle bu kişilerde TB enfeksiyonunun ortaya çıktığını düşünmekteyiz.

Gastrointestinal sisteminde görülen *Helicobacter pylori* (H. Piloni) enfeksiyonu ile ilgili olarak Klupinska ve ark.larının yapmış olduğu bir çalışmada, asemptomatik H. Piloni enfeksiyonu olan grupta gece melatonin seviyelerinin, semptomatik H. Piloni enfeksiyonu (ülser ve ülser benzeri hastalık) olan gruba göre daha yüksek olduğunu bildirilmiştir. Böylece düşük melatonin seviyelerinin, sindirim sistemi hastalıkları patogeneğinde bir rolünün olabileceği sonucuna varmışlardır (137).

Bütün bu veriler bize melatonin seviyesi ve enfeksiyon hastalıkları arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, TB enfeksiyonu ile düşük melatonin seviyesi arasında bir ilişkinin olduğu görülmektedir. Ancak bu konuda daha ileri çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır. Yapılacak çalışmalar ile melatoninin etki mekanizmasının, enfeksiyondan koruyuculuğunun ve tedavideki etkinliğinin ortaya konulması, TB ile mücadelede ve tedavisinde yeni ufuklar açılmasını sağlayacaktır.

5. KAYNAKLAR

1. Bottasso O, Bay ML, Besedovsky H, del Rey A. The immuno-endocrine component in the pathogenesis of tuberculosis. *Scand J Immunol* 2007;66:166-175.
2. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Global burden of tuberculosis: Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA* 1999;282:677-686.
3. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J* 2006;273:2813-2838.
4. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T. Melatonin in gastroprotection against stress-induced acute gastric lesions and in healing of chronic gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol* 2006;57supl 5:51-66.
5. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:313-316.
6. Bonilla E, Valero N, Chacin-Bonilla L, Medina-Leendertz S. Melatonin and viral infections. *J Pineal Res* 2004;36:73-79.
7. Olcay Yeğın. Tüberküloz immünitesi. *Çocuk Enf Derg* 2007;1Özel Sayı 1:15-22.
8. Ferraz JC, Melo FB, Albuquerque MF, Montenegro SM, Abath FG. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:1387-1397.
9. Barış Yİ . Solunum Hastalıkları Temel Yaklaşım. 2. Baskı . İstanbul. Türkiye Akciğer Hastalıkları Vakfı Yayınları. 1995;147-234.
10. Fraser RS, Müller NL, Colman N, Pare' PD: *Diagnosis of the Diseases of The Chest* . Fourth edition. Philadelphia: Saunders Company, 1999;798-848.
11. Schluger NW. The pathogenesis of tuberculosis: the first one hundred (and twenty-three) years. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:251-256.
12. Schuluger NW, Rom WN. Current Approaches to the Diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:264-267.

13. Dannenberg AM, Tomashefski FJ: Patogenezis of Pulmonary Tuberculosis. Fishman AP (editor). Fishman's pulmonary Diseases and disorders. Newyork: McGraw-Hill, 1998;2447-2471.
14. Özemsi M: Plevra Tüberkülozu. Kocabaş A (editör). Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü. 1. Baskı. Adana, 1991;151-154.
15. American Thorasic Society: Diagnostic standarts and clasification of tuberculosis in adults and children. Am J respir Crit Care Med 2000;161:1376-1395.
16. Alataş F: Tüberkülin deri testi. Özdemir N (editör). Tüberküloz. Eskişehir. Anadolu Solunum Derneği, 1997;57-70.
17. Gümüş S. Akciğer grafisine göre tüberküloz kuşkusu olan yayma negatif hastalarda bronş lavajı ve transbronşial biyopsinin tanısal değeri. Uzmanlık tezi, Ankara: GATA Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları ve Tüberküloz Bölümü, 2005.
18. Murray JF, Nadel JN. Textbook of Respiratory Medicine. New York, W.B Saunders Company,1994: 245-276.
19. Glassroth J: Diagnosis of Tuberculosis. Lung Biology in Health and Disease. Baltimor. Elsevier Science Health Science, 1993;43:149-165.
20. Schlossberg D, Tüberküloz. Tetikkurt C (çeviren) s:38-46, İstanbul, Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı, 1995.
21. Ferrer J. Pleural tuberculosis. Eur Respir J 1997;10:942-947.
22. Haas WD, Des Prez RM . Mycobacterial Diseases . Mandell GL ,Bennet JE, Dolin R (editors). Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th Edition. New York. Churchill Livingstone . 1995;2213-2243.
23. Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Esquifino AI, Perumal SR, Miller SC. Melatonin, immune function and aging. Immun Ageing 2005;29:17-29.
24. Dannenberg AMJ. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. Rev Infect Dis 1989;11:369-378.
25. Deniz Ö, Yüksekol İ, Çiftçi F, Demirci N. TB plörezisinin ayırıcı tanısında interferon gamanın tanısal değeri. Gülhane Tıp Dergisi 2001;43:122-126.

26. Dannenberg AM Jr. Patogenez ve İmmünoloji: Temel Bilgiler. Schlossberg D. Tüberküloz. Tetikkurt C (Çeviren). İstanbul. Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı, 1995;13-29.
27. MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* 2003;302: 654-659.
28. Hawn TR, Dunstan SJ, Thwaites GE, Simmons CP, Thuong NT, Lan NT et al. A polymorphism in Tollinterleukin 1 receptor domain containing adaptor protein is associated with susceptibility to meningeal tuberculosis. *J Infect Dis.* 2006;94:1127-1134.
29. Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *J Neuroimmunol* 1986;3:19-30.
30. Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem* 2002;2:167-179.
31. Miller SC, Pandi PSR, Esquifino AI, Cardinali DP, Georges JM. Maestroni, The role of melatonin in immuno-enhancement: potential application in cancer. *Int J Exp Path* 2006;87:81-87.
32. Bonilla E, Valero N, Chacin-Bonilla L, Medina-Leendertz S. Melatonin and viral infections. *J Pineal Res* 2004;36:73-9.
33. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 2005;9:11-24.
34. Pandi-Perumal S R, Srinivasan V, Maestroni G J M, Cardinali D P, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin Nature's most versatile biological signal? *Febs Journal* 2006;273:2813-2838.
35. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T. Melatonin in gastroprotection against stress-induced acute gastric lesions and in healing of chronic gastric ulcers. *J Physiol Pharmacol* 2006;57 Suppl 5:51-66.
36. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Practice Research Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2003;17:273-285.

37. Witt-Enderby PA, Radio NM, Doctor JS, Davis VL. Therapeutic treatments potentially mediated by melatonin receptors: potential clinical uses in the prevention of osteoporosis, cancer and as an adjuvant therapy. *J Pineal Res* 2006;41:297-305.
38. Lerner AB, Case J D, Takahashi Y. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958;80:2057–2058.
39. Hardeland R, Fuhrberg B. Ubiquitous melatonin–Presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends Comp Biochem Physiol* 1996;2:25–45.
40. Chen G, Huo Y, Tan DX, Liang Z, Zhang W, Zhang Y. Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sci* 2003;73:19–26.
41. Keleştimur H. İnsanda Pineal Bezin Fonksiyonları. *Fırat Üniv Sağlık Bil Dergisi* 1996;10:141-147.
42. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. Ankara. Güneş Kitabevi Ltd Şti 1995;368-369.
43. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov SV, Vesnushkin GM, Vinogradova IA. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006;1757:573–589.
44. Poeggeler B, Thuermann S, Dose A, Schoenke M, Burkhardt S, Hardeland R. Melatonin's unique radical scavenging properties-Roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J. Pineal Res.* 2002;33:20–30.
45. Reiter RJ. Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol* 1997;38:103-116.
46. Fourtillan JB, Brisson AM, Fourtillan M, Ingrand I, Decourt JP, Girault J. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. *Am J Physiol -Endocrinology and Metabolism* 2001;280:11-22.
47. Cagnacci A. Melatonin in Relation to Physiology in Adult Humans. *J Pineal Res* 1996;21:200-213.
48. Üstündağ B, Canatan H. Melatonin: Güçlü bir antioksidan ve serbest radikal giderici. *Fırat Tıp Dergisi* 1999;1:7.
49. Hardeland R, Pandi-Perumal S R, Cardinali D P. Molecules in focus melatonin. *The International J Biochemistry and Cell Biology* 2006;38:313–316.

50. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta* 1999;1472:206-214.
51. Cardinali DP, Glombek DA, Resenstien RE, Cutrera RA, Esquifino AI. Melatonin site and mechanisms of action: Single or multiple. *J Pineal Res* 1997;23:32-39
52. Dziegiel P, Podhorska-Okolow M, Zabel M. Melatonin: Adjuvant therapy of malignant tumors. *Med Sci Monit* 2008;14:64-70.
53. Gilad E, Zisapel N. High-affinity binding of melatonin to hemoglobin. *Biochem Mol Med* 1995;56:115–120.
54. Pandi-Perumal SR, Smits M, Spence W, Srinivasan V, Cardinali DP, Lowe AD, et al. Dim light melatonin onset (DLMO): a tool for the analysis of circadian phase in human sleep and chronobiological disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:1-11.
55. Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX. () Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med* 2009;15:43-50.
56. Waldhauser F, Weiszenbacher G, Tatzer E, Gisinger B, Waldhauser M, Schemper M, et al. Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J Clin End Met* 1998;66: 648–652.
57. De Leersnyder H, Bresson JL, De Blois MC, Souberbielle JC, Mogenet A, Delhotal-Landes B, et al. Beta1-adrenergic antagonists and melatonin reset the clock and restore sleep in a circadian disorder, Smith–Magenis syndrome. *J Med Genet* 2003;40:74–78.
58. Mayeda A, Mannon S, Hofstetter J, Adkins M, Baker R, Hu K, et al. Effects of indirect light and propranolol on melatonin levels in normal human subjects. *Psychiatry Res* 1998;81:9–17.
59. Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pévet P, Sassone-Corsi P. Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 1993;365:314–320.
60. Hirata, F, Hayaishi O, Tokuyama T, Senoh S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J. BiolChem* 1974;249:1311–1313.

61. Hardeland, R. Antioxidative protection by melatonin-Multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005;27:119–130.
62. Poon AM, Liu ZM, Pang CS, Brown GM, Pang SF. Evidence for a direct action of melatonin on the immune system. *Biol Signals* 1994;3:107–117.
63. Morrey KM, McLachlan JA, Serkin CD, Bakouche O. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol* 1994;153:2671-2680.
64. Castrillon P, Cardinali DP, Pazo D, Cutrera RA, Esquifino AI. Effect of superior cervical ganglionectomy on 24-h variations in hormone secretion from anterior hypophysis and in hypothalamic monoamine turnover, during the preclinical phase of Freund's adjuvant arthritis in rats. *J Neuroendocrinol* 2001;13: 288–295.
65. Maestroni GJ, Conti A, Lissoni P. Colony-stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4. *Cancer Res* 1994;54: 4740–4743.
66. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol.* 2003;50:1129-1146.
67. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004;36:1–9.
68. Şener G, Şehirli AÖ, Şatıroğlu H, Uysal MK, Yeğen BÇ. Melatonin prevents oxidative kidney damage in a rat model of thermal injury. *Life Sci* 2002;70:2977–2985.
69. Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept* 2000;9:160–171
70. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994;55:271–276.
71. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Oeggeler B, Lopez-Burillo S, Mayo JC, et al. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res* 2003;34:249–259.

72. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BL, Limson J, Weintraub ST, et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: A potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 2000;29:1177–1185.
73. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: Melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Topics Med Chem* 2002;2:181–198.
74. Maldonado MD, Murillo-Cabezas F, Calvo JR, Lardone PJ, Tan DX, Guerrero JM, et al. Melatonin as pharmacologic support in burn patients: A proposed solution to thermal injury-related lymphocytopenia and oxidative damage. *Crit Care Med* 2007;35:1177-1185.
75. Mills E, Wu P, Seely D, Guyatt G. Melatonin in the treatment of cancer: A systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis. *J Pineal Res* 2005;39:360-366.
76. Megdal SP, Kroenke CH, Laden F, Pukkala E, Schernhammer ES. Night work and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2005;41:2023-2032.
77. Sanchez-Barcelo EJ, Cos S, Fernandez R, Mediavilla MD. Melatonin and mammary cancer: a short review, *Endocr-Relat Cancer* 2003;10:153-159.
78. Anisimov VN. Melatonin and colon carcinogenesis. Bartsch C, Bartsch H, Blask DE, Cardinali DP, Hrushesky WJM, Mecke D. (Editors) () *The Pineal Gland and Cancer. Neuroimmunoendocrine Mechanisms in Malignancy*. Berlin, Springer. 2001;240-258.
79. Bartsch C, Bartsch H, Karasek M. Melatonin in clinical oncology. *Neuro Endocrinol Lett* 2002;30-38.
80. Blask DE: An overview of the neuroendocrine regulation of experimental tumor growth by melatonin and its analogues and the therapeutic use of melatonin in oncology. Bartsch C, Bartsch H, Blask DE, Cardinali DP, Hrushesky WJM, Mecke D (editors). *The Pineal Gland and Cancer*. Berlin, Springer. 2001;309-342.

81. Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as a chronobiotic / anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadianbased cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2002;2:113–132.
82. Kothari L, Shah PN, Mhatre MC. Pineal ablation in varying photoperiods and the incidence of 9,10-dimethyl-1, 2-benzanthracene-induced mammary cancer in rats. *Cancer Lett* 1984;22:99–102.
83. Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA, Krause JA, Brainard GC. Growth and fatty acid metabolism of human breast cancer (MCF-7) xenografts in nude rats: impact of constant light-induced nocturnal melatonin suppression. *Breast Cancer Res Treat* 2003;79:313-20.
84. Anisimov VN, Morozov VG, Khavinson VKh, Dilman VM. Correlation of anti-tumor activity of pineal and hypothalamic extracts, melatonin and sygetin in mouse transplantable mammary tumor. *Vopr Onkol* 1973;10: 99–101.
85. Hoang BX, Shaw DG, Pham PT, Levine SA. Neurobiological effects of melatonin as related to cancer. *European Journal of Cancer Prevention* 2007;16:511–16.
86. Cos S, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* 2005;38:136-142.
87. Sánchez-Barceló EJ, Cos S, Mediavilla D, Martínez-Campa C, González A, Alonso-González C. Melatonin-estrogen interactions in breast cancer. *J Pineal Res* 2005;38:217-22.
88. Korkmaz A, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, Reiter RJ. Role of melatonin in the epigenetic regulation of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009;115:13-27.
89. Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Esquifino AI, Cardinali DP, et al. Melatonin, environmental light, and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;108:339–350.
90. Schernhammer ES, Rosner B, Willett WC, Laden F, Colditz GA, Hankinson SE. Epidemiology of urinary melatonin in women and its relation to other hormones and night work. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:936–943.

91. Lissoni P, Barni S, Tancini G, Ardizzioia A, Ricci G, Aldeghi R, et al. A randomised study with subcutaneous low-dose interleukin 2 alone vs interleukin 2 plus the pineal neurohormone melatonin in advanced solid neoplasms other than renal cancer and melanoma. *Br J Cancer* 1994;69:196–199.
92. Lissoni P, Barni S, Mandala M, Ardizzioia A, Paolorossi F, Vaghi M, et al. Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur J Cancer* 1999;35:1688–1692.
93. Lushington K, Dawson D, Kennaway DJ, Lack L. The relationship between 6-sulphatoxymelatonin rhythm phase and age in self-reported good sleeping controls and sleep maintenance insomniacs aged 55–80 years. *Psychopharmacology* 1999;147:111–112.
94. Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Esquifino AI, Pandi Perumal SR, Miller SC. Melatonin, immune function and aging. *Immunity Ageing* 2005;2:17.
95. Pandi-Perumal SR, Seils LK, Kayumov L, Ralph MR, Lowe A, Moller H, et al. Senescence, sleep, and circadian rhythms. *AgeingRes Rev* 2002;1:559-604
96. Okatani Y, Morioka N, Wakatsuki A. Changes in nocturnal melatonin secretion in perimenopausal women: correlation with endogenous estrogen concentrations. *J Pineal Res* 2000;28:111–118.
97. Anisimov VN, Mylnikov SV, Oparina TI, Khavinson VK. Effect of melatonin and pineal peptide preparation epithalamin on life span and free radical oxidation in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* 1997;9:781–791.
98. Izmaylov DM, Obukhova LK. Geroprotector effectiveness of melatonin: investigation of life span of *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* 1999;106:233–240.
99. Bonilla E, Medina-Leendertz S, Diaz S. Extension of life span and stress resistance of *Drosophila melanogaster* by long-term supplementation with melatonin. *Exp Gerontol* 2002;37:629–638.

100. Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R, Yamasaki Y, Kudoh K, Maeda E, et al. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. *J Pineal Res* 2007;42:231–39.
101. Wang X, Jiang H, Raso J, Moreau M, Mahood J, Zhao J, et al. Characterisation of the scoliosis that develops after pinealectomy in the chicken and comparison with adolescent idiopathic scoliosis in humans. *Spine* 1997;22:2626-2635.
102. Machida M, Dubousset J, Imamura Y, Iwaya T, Yamada T, Kimura J. Role of melatonin deficiency in the development of scoliosis in pinealectomised chickens. 1995;77-B:134-8.
103. Machida M, Dubousset J, Imamura Y, Miyashita Y, Yamada T, Kimura J. Melatonin: a possible role in pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1996;21:1147–52.
104. Brodner W, Krepler P, Nicolakis M, Langer M, Kaider A, Lack W, et al. Melatonin and adolescent idiopathic scoliosis. 2000;82-B:399-403.
105. Hakanson DO, Bergstrom WH. Pineal and adrenal effects on calcium homeostasis in the rat. *Pediatr Res* 1990;27:571–573.
106. Sandyk R, Anastasiadis PG, Anninos PA, Tsagas N. Postmenopausal osteoporosis is related to pineal gland functions. *Int J Neurosci* 1992;62:215–225.
107. Kesemenli CC, Necmioğlu S. The role of melatonin as a link between head injury and enhanced osteogenesis. *Medical Hypotheses* 2005;65:605–606.
108. Scheer FA, Van Doornen LJ, Buijs RM. Light and diurnal cycle affect human heart rate: possible role for the circadian pacemaker. *J Biol Rhythms* 1999;14:202-212.
109. Warren WS, Cassone VM. The pineal gland: photoreception and coupling of behavioral, metabolic, and cardiovascular circadian outputs. *J Biol Rhythms* 1995;10:64-79.
110. Laflamme A, Wu L, deChamplain J. Impaired basal sympathetic tone and alpha 1-adrenergic responsiveness in association with the hypotensive effect of melatonin in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1998;11:219-229.

111. Zaslavskaja RM, Komarov FI, Shakirova AN, Teiblium MM, Akhmetov KZ. Effect of moxonidine monotherapy and in combination with melatonin on hemodynamic parameters in patients with arterial hypertension. *Klin Med* 2000;78:41-42.
112. Lusardi P, Piazza E, Fogari R. Cardiovascular effects of melatonin in hypertensive patients well controlled by nifedipine: a 24-hour study. *Br J Clin Pharmacol* 2000; 49:423-427.
113. Brugger P, Marktl W, Herold M. Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease. *Lancet* 1995;345:1408.
114. Sakotnik A, Liebmann PM, Stoschitzky K, Lercher P, Schauenstein K, Klein W et al. Decreased melatonin synthesis in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 1999;20:1314-1317.
115. Hruskesky WJM. Melatonin cancer therapy. Bartsch C, Bartsch H, Blask DE, Cardinali DP, Hrushesky WJM, Mecke D, (editors). *The pineal gland and cancer*. Berlin, Springer-Verlag, 2000;476–508.
116. Raghavendra V, Agrewala JN, Kulkarni SK. Melatonin reversal of lipopolysaccharides-induced thermal and behavioral hyperalgesia in mice. *Eur J Pharmacol* 2000;395:15–21.
117. Tekbas OF, Ogur R, Korkmaz A, Kilic A, Reiter RJ. Melatonin as an antibiotic: new insights into the actions of this ubiquitous molecule. *J Pineal Res* 2008;44:222-226.
118. Kulczykowska E, Kasprzak M, Kalamarz H, Kuriata M, Nietrzeba M, Jerzak L, et al. Melatonin and thyroxine response to pollution in white stork nestlings (*Ciconia ciconia*): aspects of rhythmicity and age. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2007;146:392-397.
119. Venkataraman P, Krishnamoorthy G, Vengatesh G, Srinivasan N, Aruldas MM, Arunakaran J. Protective role of melatonin on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress and changes in acetylcholine esterase and membrane bound ATPases in cerebellum, cerebral cortex and hippocampus of adult rat brain. *Int J Devl Neuroscience* 2008;26:585–591.

120. Fourtillan JB, Brisson AM, Fourtillan M, Ingrand I, Decourt JP, Girault J. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:11–22.
121. Rizzo V, Portab C, Moronic M, Scogliod E, Morattia R. Determination of free and total (free plus protein-bound) melatonin in plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography* 2002;774:17–24.
122. Römsing S, Ulfberg J, Bergqvist Y. Determination of melatonin in human plasma with solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Scand J Clin Lab Invest* 2003;63: 81–88.
123. Mahlberga R, Tilmanna A, Salewskib L, Kunza D. Normative data on the daily profile of urinary 6-sulphatoxymelatonin in healthy subjects between the ages of 20 and 84. *Psychoneuroendocrinology* 2006;31:634–641.
124. Minami M, Takahashi H, Inagaki H, Yamano Y, Onoue S, Matsumoto S, et al. Novel tryptamine-related substances, 5-sulphatoxydiacetyltryptamine, 5-hydroxydiacetyltryptamine, and reduced melatonin in human urine and the determination of those compounds, 6-sulphatoxymelatonin, and melatonin with fluorometric HPLC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:814-822.
125. Middleton B. Measurement of melatonin and 6-sulphatoxymelatonin. *Methods Mol Biol* 2006;324:235-254.
126. Covaci A, Doneanu C, Aboul-Enein HY, Schepens P. Determination of melatonin in pharmaceutical formulations and human plasma by gas chromatography- electron impact mass spectrometry. *Biomed Chromatog* 1999;13:431–436.
127. Torano SJ, Van Rijn-Bikker P, Merkus P, Cuchelaar HJ. Quantitative determination of melatonin in human plasma and cerebrospinal fluid with high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Biomed Chromatog* 2000;14:306–410.
128. Abe M, Itoh M, Miyata M, Ishikawa S, Sumi Y. Detection Of Melatonin, Its Precursors And Related Enzyme Activities In Rabbit Lens. *Exp Eye Res* 1999;68:255-262.
129. Dunlap NE, Briles DE. Immunology of tuberculosis. *Med Clin North Am* 1993; 77:1235-1251.

130. Winslow GM, Cooper A, Reiley W, Chatterjee M, Woodland DL. Early T-cell responses in tuberculosis immunity. *Immunol Rev* 2008;225:284-299.
131. Cooper AM, Khader SA. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunol Rev* 2008;226:191-204.
132. Lioté H. Tuberculosis, anti-TNF agents and other immuno suppressants: evolution of preventitive strategies. *Rev Mal Respir.* 2008;25:1237-1249.
133. Santello FH, Frare EO, dosSantos CD, Caetano LC, Alonso Toldo MP, doPrado JC Jr. Suppressive action of melatonin on the TH-2 immune response in rats infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Pineal Res* 2008;45:291-6.
134. Santello FH, Frare EO, Caetano LC, AlonsoToldo MP, doPrado JC Jr. Melatonin enhances pro-inflammatory cytokine levels and protects against Chagas disease. *J Pineal Res* 2008;45:79-85.
135. İmamoğlu M, Cay A, Cobanoglu U, Bahat E, Karahan C, Tosun I, et al. Effects of melatonin on suppression of renal scarring in experimental model of pyelonephritis. *Urology* 2006;67:1315-1319.
136. Yavuz T, Kaya D, Behçet M, Ozturk E, Yavuz O. Effects of melatonin on *Candida* sepsis in an experimental rat model. *Adv Ther* 2007;24:91-100.
137. Klupińska G, Chojnacki C, Harasiuk A, Stepień A, Wichan P, Stec-Michalska K, et al. Nocturnal secretion of melatonin in subjects with asymptomatic and symptomatic *Helicobacter pylori* infection. *Pol Merkur Lekarski* 2006;21:239-242.

6. ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Zonguldak Ereğli’de doğmuşum. İlkokulu Ereğli TED Koleji’nde, ortaokul ve liseyi Ereğli Anadolu Lisesinde tamamladıktan sonra Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden 1996 yılında mezun oldum. Sırasıyla Bingöl Ilıcalar Sağlık Ocağı (SO), Edirne Süloğlu SO, Ankara 9 nolu AÇSAP merkezi, Herman Hastanesi (Teksas Üniversitesi ABD), Ankara Gülveren SO, Hacettepe Üniversitesi Halk Sağlığı AD’da, Ankara Çiğiltepe SO’larında çalıştıktan sonra 2005 yılında Elazığ Fırat Üniveristesinde Biyokimya AD’da araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. Bir yıl süreyle aynı üniversite adına GATA Biyokimya AD’da araştırma görevlisi olarak çalıştım. Evliyim. İngilizce biliyorum.