

Ratlarda Beyin İskemi–Reperfüzyonu Sonucu Oluşan Morfolojik Değişikliklere Melatonin ve Pinealektomi'nin Etkisi

Ahmet KAVAKLI¹
Ahmet ACET²
Hakan PARLAKPINAR²
Nusret AKPOLAT³
Engin ŞAHNA⁴

¹ Fırat Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı
Elazığ-TÜRKİYE

² İnönü Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Malatya-TÜRKİYE

³ Fırat Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı
Elazığ-TÜRKİYE

⁴ İnönü Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Malatya-TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 04.10.2006
Kabul Tarihi : 16.11.2006

Yazışma Adresi Correspondence

Ahmet KAVAKLI
Fırat Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı
23119
Elazığ-TÜRKİYE

akavakli@firat.edu.tr

Beyin iskemisi–reperfüzyonu sonucu oluşan histopatolojik değişikliklere melatonin ve pinealektomi'nin etkilerini değerlendirmektedir.

Ratlar üç gruba ayrıldı: Kontrol, pinealektomi (PX) ve PX + melatonin. Ratlara iskemisi-reperfüzyon yapılmadan 3 ay önce pinealektomi yapıldı. Melatonin 4 mg/kg/ ip olarak pinealektomi yapılmış ratlara son bir ay süresince verildi. Beyinde hasar oluşturmak için arteria cerebri media 60 dakika okluze edildi ve devamında 24 saat reperfüzyon yapıldı. Çalışmanın sonunda ratlar sacripiye edildi ve beyinleri hızlıca çıkarıldı. Rutin histopatolojik inceleme için formaldehit solusyonuna konuldu.

İskemiye bağlı beyinde yaygın nekrotik sahalarda, vakuolizasyon, eosinofilik degenerasyon ve vasküler konjesyon gözlemlendi. Pinealektomi yapılanlarda beyin iskemisi-reperfüzyonuna bağlı oluşan hasar belirgin derecede artmıştı. Elde edilen sonuçlara göre dışardan verilen melatonin en az fizyolojik melatonin kadar beyin iskemisi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Pinealektomi, melatonin, beyin, iskemisi-reperfüzyon

Effects of Pinelectomy and Melatonin on brain ischemia – reperfüzyon induced morphologic changes in rats

The purpose of the present study was to evaluate the effects of melatonin and pinealectomy on histopathological changes resulting from brain ischemia-reperfusion method.

Rats were divided into three groups: sham-operated (control), pinealectomized with melatonin, pinealectomized. Rats were operated for 3 months before the ischemia-reperfusion studies. Melatonin (4 mg/kg i.p) was given to pinealectomized rats for last 30 days. To produce brain damage, middle cerebral artery was occluded for 60 min, followed by 24 h reperfusion. At the end of each in vivo study, the rats were sacrificed and the brains were quickly removed, and were in formaldehyde solution for routine histopathological examination.

Depending on ischemia-reperfusion, widespread necrotic areas, vacuolization, eosinophilic degeneration and vascular congestion were observed in the brain slices. Pinealectomy leads to markedly increasing this damage resulted from brain ischemia-reperfusion. These data suggest that physiologic melatonin release as well as exogenously given melatonin has a neuroprotective effect in focal cerebral ischemia.

Key Words: Pinelectomy, melatonin, brain, ischemia-reperfusion

Giriş

Beyin canlıların mental ve motor fonksiyonlarının oluşmasında temel ve fonksiyonel önemi olan, aynı zamanda hasarlanmaya karşıda çok hassas olan bir organdır. Yaşlanmayla birlikte aterosklerotik sürecin hızlanması sonucunda tromboembolik olayların sıklığında artış görülmekte ve bu da serebral kan damarlarının tıkanması ve iskemisi oluşumu riskini artırmaktadır (1). Bu nedenle felç modelleri üzerinde yapılan deneysel çalışmalar giderek artmıştır. Trombolitik tedavinin felçli hastalarda kullanılmaya başlanması ile reperfüzyon hasarı ve sonuçları gündeme gelmiştir (2). İskemik dokuya yeniden kan akımının sağlanmasına rağmen, fonksiyonel düzelmeye beklenildiği kadar iyi sonuçlar vermemektedir. Reperfüzyon ile birlikte yeniden oksijen sağlanması, aşırı serbest radikal oluşmasına neden olur (3,4,5). Serbest radikal süpürücü ve antioksidan olan melatoninin iskemisi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu-luğu bir çok çalışmada gösterilmiştir (2,3,4,6,7). Fokal serebral iskemisi modelleri insanda oluşan iskemisiye benzer tablolar oluşturması ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesi nedeni ile son yıllarda en çok tercih edilen deneysel metotlardan biri haline gelmiştir. Lümen içi iplik modeli ile oluşturulan (8) fokal serebral iskemisi modelinde kolaylıkla reperfüzyonda gerçekleştirilebilmektedir. İskemisi-reperfüzyon sonucu oluşan serebral hasarın patogenezinde serbest radikallerin aşırı üretimi önemlidir.

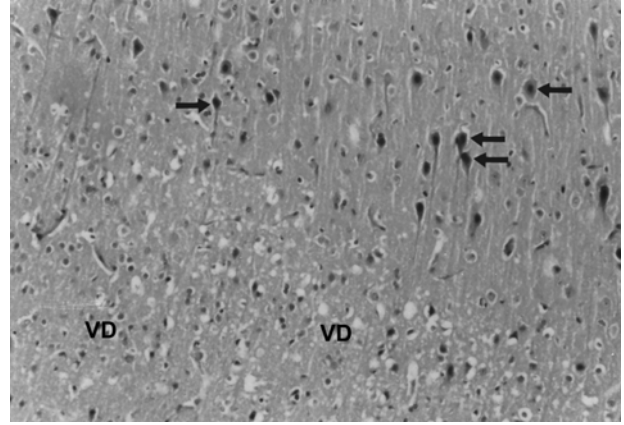
Pineal bezden salınan bir hormon olan melatoninin (5-methoxy-N-acetyl-tryptamine) birçok biyolojik etkisinin yanısıra, hücre içi kalsiyum düzeyini düzenleyebilmesi (9), güçlü bir radikal süpürücü (hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, peroksil radikali, singlet oksijen ve peroksinitrit anyonu) ve antioksidan (SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz stimülasyonu ve Nitrik oksit sentaz inhibisyonu) özelliğinin olması, I/R hasarında etkili bir koruyucu olabileceğini düşündürmektedir (4,7,10,11,12). Çalışmamızın amacı damar içi iplik metoduyla sağ Arteria cerebri media okluzyonu (MCAO) yaparak beyinde oluşan histopatolojik değişikliklere melatoninin ve pinealektominin etkilerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

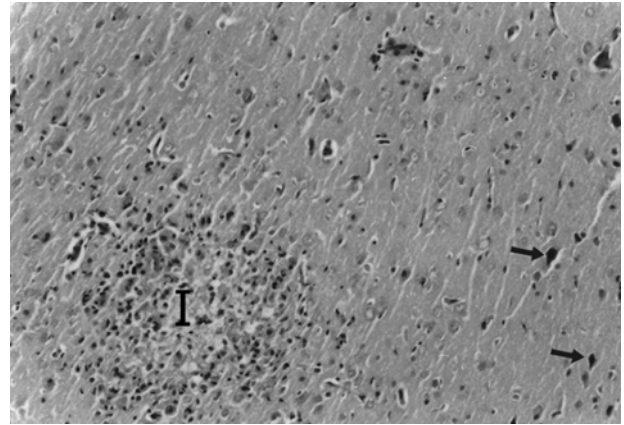
Çalışmamızda ağırlıkları 200-300 gram olan erkek wistar cinsi rat kullanıldı (deney süresince ex olan ratlar çıkarıldıktan sonra her grup için n: 8). Ratlar diümal ışık şartlarında (12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık) ve deney öncesinde su içmelerine izin verilerek aç kalacak şekilde hazırlandı. Ratlar üç gruba ayrıldı. Kontrol (sadece MCAO), pinealektomi (PX) (PX+MCAO) ve PX + melatonin (PX+M+MCAO). Böylece bütün gruplara beyin iskemi ve reperfüzyonu yapılmış oldu. Ratlara iskemi-reperfüzyon yapılmadan 3 ay önce pinealektomi yapıldı. Melatonin 4 mg/kg/ ip olarak pinealektomi yapılmış ratlara son bir ay süresince verildi (13). Anestezik olarak bütün deneyler için periton içi (ip) ketamine hydrochloride 75 mg/kg (Ketalar, Parke-Davis) + Xylazine 8 mg /kg (Rompun, Bayer) kombinasyonu kullanıldı. Sağ a. cerebri media daha önce tanımlandığı gibi (8) lumen içi iplik metodu ile 1 saat okluze (iskemi), takiben 24 saat reperfüze edildi. İşlemin sonunda ratlar sakrifiye edildi, beyinler çıkarıldı ve rutin histopatolojik çalışma için formaldehite konuldu. Kesitler Hematoksilen Eosin ve Toluidin blue ile boyandı. İskemik değişiklikler semikantitatif olarak değerlendirildi (0- yok, 1- hafif, 2- orta, 3- şiddetli)

Bulgular

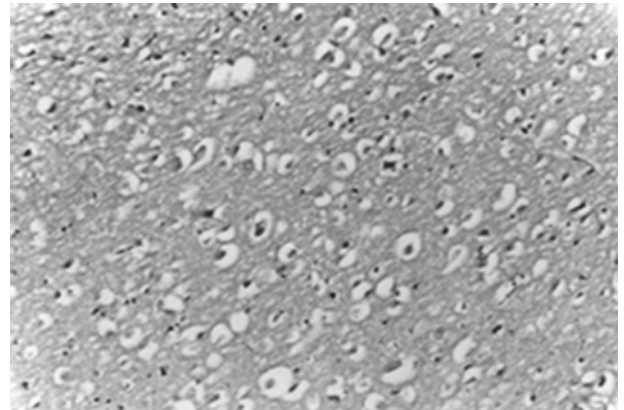
Yapılan incelemede iskemi-reperfüzyona bağlı olarak ödem, enfarkt, vakuolizasyon, eozinofilik dejenerasyon (red nöron) ve konjesyon değerlendirildi (14). Kontrol grubunda red nöron ve konjesyon orta derecede görülürken; ödem, vakuolizasyon ve enfarkt'ın hafif derecede olduğu gözlemlendi. PX grubunda ödem, red nöron ve vakuolizasyon şiddetli derecede iken enfarkt ve konjesyon orta derecedeydi. PX+M grubunda ise sadece vakuolizasyon orta derecedeydi. Diğer parametreler ise hafif derecedeydi. Böylece PX grubunda hasar daha yaygın iken melatonin verilen grupta bu bulgular azalmıştı. Sonuçlar Tablo 1 ve Resim 1-5 de gösterilmiştir.



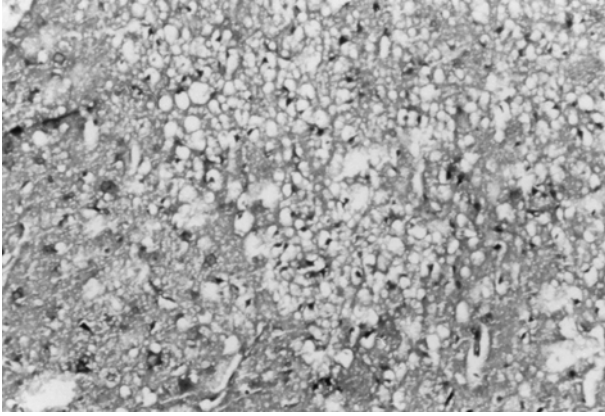
Şekil 1. I/R grubu (kontrol). Çok sayıda red nöron (→), yaygın vakuolar dejenerasyon (VD) ve ödem görülmekte. H-E, X100.



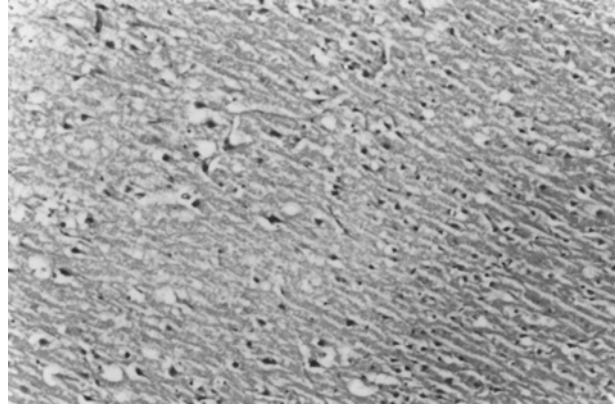
Şekil 2. I/R grubu (kontrol). Red nöron (→) ve Enfarkt (I) alanı izlenmekte. H-E, X100.



Şekil 3. PX + I/R grubu. Perinükleer belirgin ödem, red nöron izlenmekte. H-E, X100



Şekil 4. PX + I/R grubu. Şiddetli derecede vakuolar dejenerasyon ve ödem görülmekte. Toluidin Blue, X100.



Şekil 5. PX + I/R + Melatonin grubu. Hafif derecede ödem ve vakuolar dejenerasyon izlenmekte. H-E, X100.

Tablo 1. İskemik Beyin Dokusunda Işık Mikroskopik Bulgular (PX:pinealektomi, PX+M:Pinealektomi+Melatonin) (Her grup için n: 8)

Grup	Ödem	Enfarkt	Eozinofilik Dejenerasyon (red nöron)	Vakuolizasyon	Konjesyon
Kontrol	1	1	2	1	2
PX	3	2	3	3	2
PX + M	1	0	1	2	1

0. Yok, 1. Hafif, 2. Orta, 3. Şiddetli

Tartışma

Bir çok serbest radikal süpürücü ve antioksidanın iskemi-reperfüzyon hasarında yararlı etkileri gösterilmiştir (6). Yapılan çalışmalarda melatoninin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı önemli koruyucu etkileri rapor edilmiştir (2,13,15).

Pineal bezden salgılanan melatonin, direk radikal süpürücü ve antioksidandır (16). Bununla birlikte, melatoninin yüksek lipofilik bir yapıya sahip olduğu çok iyi bilinmektedir (17). Hücrenin tüm komponentlerine kolayca girebilir ve bu özelliği iskemik dokudaki koruyuculuğunu açıklamaktadır. PX yapılmadan MCAO yapılan ve melatonin uygulanan çeşitli çalışmalar yapılmıştır (2,12,18,19,20). Şahna ve ark. yaptıkları çalışmalarda myokard iskemi - reperfüzyon sonrası meydana gelen mortalite, aritmi (3). ve nekroz oranını (21) ve oksidatif değişiklikleri (5) melatoninin anlamlı azaltabildiğini ve yine böbrekte yaptıkları çalışmalardada melatoninin renal iskemi reperfüzyon (22) sonucu meydana gelen patolojik ve biyokimyasal değişiklikleri önleyebildiğini göstermişlerdir.

Beyin de yapılan çalışma-da da melatonin iskemi reperfüzyon hasarını önemli ölçü de azaltabilmiştir (2,13) Bu çalışmalarda melatoninin koruyucu etkisi olduğu ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan hasarı azalttığı sonucuna varılmıştır. Genellikle melatonin dışardan verilmiş ve fizyolojik melatonin salgılanması devam etmiştir. PX yapılan ratlara MCAO ve Melatonin uygula-

yan çalışmalarda olmuştur (13,23). Kılıç ve arkadaşları (13) PX yaptıktan sonra 3 ay beklemiş ve sonra MCAO yaparak melatonin uygulamışlardır. Melatoninin değişik zamanlarda ve farklı dozlarda uygulanmışlar (iskeminin 1.dk, reperfüzyonun 1.dk, 4 ve 8 mg/kg).

Çalışmamızda MCAO dan önce PX yaptık ve 3 ay bekledik. Ardından bir ay boyunca günde 4 mg/kg dozunda melatonin uygulaması yaptık. Böylece subkronik dozda eksojen melatonin uygulanmış oldu. Daha sonra MCAO yaptık. Bir ay süreyle melatonin uygulamasının ciddi oranda iskemik hasarı azalttığı sonucunu tespit ettik (Tablo 1). Bizim çalışmamız sonuçlar yönünden önceki çalışmalarla benzerlik göstermekle beraber, hem melatonin uygulamasının farklılığı hem de histopatolojik olarak değerlendirilme yapılması yönünden diğer çalışmalardan farklıydı. Biz daha uzun süreli bir tedavi uygulaması yapmamıza karşın Kılıç ve arkadaşları (13) tek doz ve hemen iskemi başlangıcında vermişlerdi. Burada belki dikkati çekecek en önemli nokta PX+MCAO yapılan grubun sonuçlarıydı. Özellikle bu grupta MCAO yapıldığı sırada ciddi kanamalar sonucu 4 rat ex oldu. Bu ratlarda iskemi bulguları hem kontrol hem de melatonin uygulanan gruba göre daha şiddetliydi. Bu sonuç fizyolojik melatoninin koruyucu bir özelliği olduğunu düşündürmekteydi. PX+M+MCAO grubundaki sonuçlar; dışardan verilen melatoninin en az fizyolojik melatonin kadar iskemide koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

Kaynaklar

1. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain J Cereb Blood Flow Metab 2001; 21:2-14.
2. Kavakli A, Sahna E, Parlakpınar H, Yahsi S, Ogeturk M, Acet A. The effects of melatonin on focal cerebral ischemia – reperfusion model. Saudi Med. J 2004;25(11): 1751 - 1752.
3. Sahna E, Olmez E, Acet A. Effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on ischemia-reperfusion arrhythmias in rats: can we reduce the incidence of sudden cardiac deaths. J Pineal Res 2002;32:194-8
4. Sahna E, Deniz E, Aksulu HE. Myocardial ischemia-reperfusion injury and melatonin] Anadolu Kardiyol Derg. 2006 Jun;6(2):163-8
5. Sahna E, Parlakpınar H, Türköz Y, Acet A. Effects of melatonin on myocardial ischemia-reperfusion-induced infarct size and oxidative stress. Physiological Res 2005 (in pres)
6. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Pharmacol. Rev. 2001; 53:135-159.
7. Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ, Wenbo QI. Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. Proc West Pharmacol Soc 1998;41:229-36.
8. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible Middle cerebral Artery Occlusion Without Craniectomy in Rats. Stroke 1989;20 :84-91
9. Vanecek J. Melatonin inhibits increase of intracellular calcium and cyclic AMP in neonatal rat pituitary via independent pathways. Mol Cell Endocrinol. 1995;107:149-153.
10. Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: A novel protective agent against oxidative injury of the ischemic-reperfused heart. Cardiovascular Research 2003;58:10-19.
11. Letechipia-Vallejo G, Gonzalez-Burgos I, Cervantes M. Neuroprotective effect of melatonin on brain damage induced by acute global cerebral ischemia in cats Archives of Medical Research 2001;32:186 -192.
12. Cho S, Joh TH, Baik HH, Dibinis C, Volpe BT. Melatonin administration protects CA1 hippocampal neurons after transient forebrain ischemia in rats. Brain Research 1997;755:335 - 338.
13. Kılıç E, Özdemir YG, Bolay H, Keleştimur H, Dalkara T. Pinealectomy Aggravates and Melatonin Brain Damage in Focal Ischemia. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 1999;19:511-516.
14. Powers JM, Horoupian DS. Chapter 77 Central nervous system. In: Damjanov I, Linder J (Editors). Anderson's Pathology. Volume 2, St. Louis: Mosby –Year Book, Inc, 1996;2706-8.
15. Pei Z, Ho HTS, Cheung RTF. Pre-treatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a permanent middle cerebral artery occlusion stroke model in the rat. Neuroscience Letters 2002;318:141-144.
16. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. Cell Biochem Biophys 2001;34:237-56
17. Reiter RJ. Melatonin: That ubiquitously Acting Pineal Hormone. News Physiol Sci 1991;6:223-227.
18. Kondoh T, Uneyama H, Nishino H, Torii K. Melatonin reduced cerebral edema formation caused by transient forebrain ischemia in rats. Life Sciences 2002;72:583-590.
19. Sinha K, Degaonkar MN, Jagannathan NR. Effect of melatonin on ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats European Journal of Pharmacology 2001;428:185-192.
20. Gupta YK, Chaudhary G, Sinha K. Enhanced protection by melatonin and meloxicam combination in a middle cerebral artery occlusion model of acute ischemic stroke in rat. Can J Physiol Pharmacol 2002;80:210-217.
21. Sahna E, Acet A, Ozer MK, Olmez E. Myocardial ischemia–reperfusion in rats: Reduction of infarct size by either supplemental physiological or pharmacological doses of melatonin. J Pineal Res 2002;33:234-8.
22. Sahna E, Parlakpınar H, Ozturk F, Cigremis Y, Acet A. The protective effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. Urol Res 2003;31:188-93.
23. Butte MD, Fortin T, Pappas BA. Pinealectomy: behavioral and neuropathological consequences in a chronic cerebral hypoperfusion model. Neurobiology of Aging 2002;23:309-317.