

HİPOKSİ İLE OLUŞTURULAN MYOKARDİYAL HASAR ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİSİ

The Effects of Melatonin on the Myocardial Damage, Induced by Hypoxia

Figen NARİN¹, Fatmagül BAŞARSLAN², Hülya AKGÜN³, Aynur AKIN⁴,
Ali BAYKAN², Recep SARAYMEN⁵, Sibel KUZUGÜDEN⁶, Selda YAVAŞCAN²

Özet : Sunulan çalışmada hipoksik hasarın etyopatogenezinde yer alan serbest radikallerin, lipid peroksidasyon ürünlerinin ve antioksidan enzimlerin rolünü değerlendirmek amaçlanmıştır. Çalışmada deney hayvanı olarak tavşan kullanıldı. Tavşanlar; Grup I: Hipoksi grubu (n=9), Grup II: Hipoksi+Melatonin grubu (n=9), Grup III: Kontrol grubu (n=7) olmak üzere üç gruba ayrıldılar. Hipoksi oluşturulmadan önce bazal serum troponin I, kreatin kinaz-MB (CKMB), laktat dehidrojenaz (LDH), plazma glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri için kan alındı. Grup I, II' deki deney hayvanları bir fanus içerisinde 5 lt/10 dk akımla %10 oksijen-azot karışımına maruz bırakılarak hipoksi oluşturuldu. İkinci grupta hipoksi oluşturulduktan sonra 5 gün süreyle melatonin (10 mg/kg/gün intraperitoneal) verildi. Tedavi sonunda serum CKMB, LDH ve troponin I, plazma NO, MDA, SOD ve GSH-Px düzeyleri çalışıldı. Tavşanlar sakrifiye edilip miyokardiyal NO, MDA, SOD, GSH-Px düzeyleri çalışıldı ve histopatolojik olarak miyokard dokusu Hemotoksilen-Eozin boyama ile değerlendirildi. Hipoksi oluşturulan birinci grup, tavşanlarda serum CKMB, LDH, troponin I düzeylerinde artış, plazma SOD'de, GSH-Px'da azalma ve histopatolojik olarak miyokard liflerinde şişme, interstisyel ödem, disorganizasyon ve nekrozdan oluşan ağır kardiyomyopati tesbit edildi. Hipoksi+ Melatonin uygulanan grupta; plazma SOD düzeylerinde anlamlı artış, doku NO ve MDA düzeylerinde anlamlı düşme tesbit edildi. Histopatolojik incelemede, melatonin grubunda; miyokard liflerinde şişme, interstisyel ödem ve disorganizasyondan oluşan hafif-orta kardiyomyopati tesbit edildi. Sonuç olarak; melatoninin antioksidan etkinlik sağlayarak hipoksiye bağlı kardiyak hasarı önleyebileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: Hipoksi, miyokardiyal hasar, malondialdehit, melatonin.

Kardiyovasküler hastalıklarda hipoksi ve iskeminin özel bir yeri vardır (1). Hipoksi ve iskemi sırasında oluşan miyokardiyal hasarın etyopatogenezine ve

Summary : The aim of this study was to evaluate the role of antioxidant enzymes, lipid peroxidation products and free radicals which involve in the etiopathogenesis of the hypoxic damage. The experimental animals were assigned to 5 groups. Group I: Hypoxia group (n=9), Group II: Hypoxia + melatonin group (n=9), Group III: Control group (n=7). Blood was taken for analysing the levels of basal serum troponin I, creatine kinase-MB (CKMB), lactate dehydrogenase(LDH), plasma glutation peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) before inducing the hypoxia. In the experimental animals of groups I, II, the hypoxia was induced by leaving the animals to breathe in belljar, containing 10 per cent oxygen-nitrogen mixture, for 10 minutes at 5 liter velocity. After inducing the hypoxia melatonin (10 mg/kg/daily & intraperitoneal) was administered to the animals of second group during 5 days. The levels of serum CKMB, LDH and troponin I, plasma NO, MDA, SOD and GSH-Px were analysed at the end of the treatment. After sacrificing the experimental animals, the levels of myocardial NO, MDA, SOD, GSH-Px were analysed and myocardial tissue was examined histopathologically with haematoxylin - eosin stain. The levels of serum-CMKB, LDH and troponin I were found increased; whereas the levels of plasma SOD and GSH-Px were found decreased in the hypoxia-induced group and a heavy cardiomyopathy associated with swelling in myocardial flaments, interstitial edema, disorganization and necrosis was determined. There was a meaningful increase in the levels of plasma SOD but a meaningful decrease in the levels of tissue NO and MDA and a mild and intermediate cardiomyopathy associated with swelling, interstitial edema and disorganization was shown histopathologically in the second group (hypoxia and melatonin). It is shown that the melatonin can protect the hypoxic cardiac damage by being activated as an antioxidant.

Key words: Hypoxia, myocardial damage, malondialdehyde, melatonin.

önleneğine yönelik çalışmalara günümüzde devam edilmektedir. Hipoksiye bağlı miyokardiyal hasarlanmanın patogenezinde serbest radikal ve antioksidan enzimlerin rolünün belirlenmesi, antioksidan tedavi denemelerini gündeme getirmiştir (2).

¹ Yrd.Doç.Dr.Erc.Ün.Tıp Fak, Biyokimya AD, Kayseri

² Dr. Erc. Ün, Tıp Fak, Pediatri AD,Kayseri

³ Öğr.Gör.Dr.Erc.Ün.Tıp Fak, Patoloji AD, Kayseri

⁴ Yrd.Doç.Dr.Erc.Ün.Tıp Fak, Anestezi ve Rean AD, Kayseri

⁵ Uzm.Dr.Erc.Ün.Tıp Fak, Biyoloji AD, Kayseri

⁶ Araş.Gör.Dr.Erc.Ün.Tıp Fak, Biyokimya AD, Kayseri

Herhangi bir nedenle oluşan myokardiyal hipoksi ve/veya iskemi sırasında ortaya çıkan serbest radikaller, sitokinler ve nitrik oksit (NO) iskeminin erken evresinde, nötrofil ve monositlerin intimayı infiltre ederek endotel hücrelerinde hasara neden olması sonucu ortaya çıkar ve lipid peroksidasyonunu indüklerler (3). Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünleri de myokardiyal hasarda rol oynar (4).

Myokardial hasar için serum kreatin kinaz (CK), laktat dehidrogenaz ve troponin I düzeylerindeki artışlar belirleyici olarak kullanılmakta (1) ve hipoksiye bağlı myokardiyal hasarın önlenmesinde uygun antioksidan ajanların belirlenmesine yönelik çalışmalar sürdürülmektedir (2).

Pineal bezden salgılanan bir hormon olan melatonin, toksik hidroksil ve peroksil radikallerinin, peroksinitritlerin ve diğer oksijen radikallerinin temizlenmesinde rol oynayarak (5) ve süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimleri stimüle ederek antioksidan aktivite göstermektedir (5,6). Melatoninin myokardiyal hasarın önlenmesinde olumlu etkilerini ortaya koyan deneysel çalışmalarda, serbest radikallere bağlı patofizyolojik olayları engelleyici, nükleer DNA'yı ve membran lipidlerini oksidatif hasardan koruyucu özellikleri gösterilmiştir (7).

Çalışmada hipoksi ile myokardial hasar oluşturuldu. Melatoninin doku hasarını önleyici etkisi troponin I ve CKMB düzeyleri çalışılarak araştırıldı. Ayrıca doku hasarı ile ilişkili olarak SOD, NO, GPX ve MPO üzerine melatonin etkisi incelendi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalı, Patoloji ve Biyokimya Anabilim dallarının işbirliği ile Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Çalışmada, 1300-2200 gram ağırlığında 25 adet

tavşan kullanıldı.

Hayvanlar bir haftalık adaptasyon döneminden sonra 3 gruba ayrıldı.

I.Grup: Hipoksi Grubu (sadece hipoksi oluşturulan grup, n=9)

II.Grup: Hipoksi+ Melatonin Grubu (hipoksi sonrası melatonin uygulanan grup, n=9)

III. Grup: Kontrol Grubu (distile su uygulanan grup, n=7)

Hipoksi oluşturulması: 25x25x62 cm ebatlarında hava giriş ve çıkış deliği olan cam fanus %10 oksijen içerisinde azot karışımı ile 5dk 5 lt akım yapıldıktan sonra deney hayvanı içerisine konuldu. %10 Oksijen-%90 azot karışımı aynı akımla 10 dk. verilmeye devam edildi. Bu sırada deney hayvanının oksijenasyonu ve kalp hızı puls oksimetre ile monitorize edildi. Daha sonra deney hayvanı oda havasında solutuldu (8). Deney hayvanında bradikardi ve solunum depresyonu gelişti ise işleme son verildi.

Hipoksi+Melatonin Uygulaması: Hipoksi I. Gruba uygulandığı şekilde, melatonin (Sigma Chemical Company, Sigma, St.Louis.MO) 10mg/kg/gün olacak şekilde hipoksi oluşturulduktan hemen sonra başlanarak, 5 gün devam edilecek şekilde, intraperitoneal olarak verildi.

Adaptasyon süresinin sonunda, birinci ve ikinci grupların bazal (başlangıç=0.gün) serum troponin I, serum CKMB, serum LDH, plazma GSH-Px, SOD, MDA ve NO düzeyleri, Hipoksi oluşturulduktan 6 gün sonra, birinci ve ikinci grupların çalışma sonu serum troponin I, serum CKMB, serum LDH, plazma GSH-Px, SOD, MDA ve NO düzeyleri, 6. gün, çalışma sonu tüm grupların kalp dokusu GSH-Px, SOD, MDA ve NO düzeyleri çalışıldı. Sakrifiye edilen hayvanların kardiyak dokuları histopatolojik olarak incelendi.

CKMB ve troponin I düzeyleri, dondurularak saklanan serum örnekleri çözündükten sonra aynı gün çalışıldı. Serum CKMB düzeyi, Konelab 60İ otoanalizör ile Medkim firmasının CKMB düzeyleri ölçümü için

ürettiği reagent kitler kullanılarak 0.5 cc serumda çalışıldı. Serum troponin I düzeyleri, İnnotrac Aio İmmunoanalyzer cihazı ile İnnotrac Aio TM Troponin I Analyte Pen kiti ile 0.5 cc serumda çalışıldı. Serum LDH düzeyleri, Konelab otoanalizör ile Medkim firmasının LDH düzeyleri ölçümü için ürettiği reagent kitler kullanılarak 0.5 cc serumda çalışıldı.

Plazma ve miyokardiyal GSH-Px aktivitesi; GSH-Px tarafından katalizlenen bir reaksiyonda H₂O₂ ile glutatyonun (GSH) oksidasyon hızının ölçülmesi esasına dayanan Paglia ve Valentine'nin birleşik enzimatik yöntemi (9) ile ölçüldü. Doku GSH-Px aktivitesi tayini: Miyokardiyal homojenatının (1/4 w/v) 13200 rpm'de 30 dk santrifüjlenmesiyle elde edilen süpernatantın fosfat tamponu (0.05 M, pH = 7.4) ile 1/10 oranında dilüe edilip, 0.05 ml'si kullanılarak yapıldı (9).

Plazma ve miyokardiyal SOD aktivitesi tayininde Sun ve ark. (10) tarafından geliştirilen "Süperoksit üreticisi olarak ksantin oksidaz sisteminin kullanılması ve nitroblue tetrazoliumun (NBT) redüksiyonunun inhibe edilmesi" esasına dayanan metod kullanıldı. Doku SOD aktivitesi tayini: miyokardiyal homojenatından elde edilen süpernatantın 0.05 ml'sinin, 0.01 M fosfat tamponu (pH:7.4) ile 1/10 oranında dilüe edilerek yapıldı.

Plazma MDA aktivitesi tayini: Jain (11) tarafından modifiye edilen temel prensibi "Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan MDA'nin tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 532 nm dalga boyunda maksimum absorban veren renkli bir kompleks oluşturması" esasına dayanan metodu kullanılarak yapıldı. Doku MDA tayini, Ohkawa ve ark. (12) tarafından geliştirilen metoda göre yapıldı.

Doku NO tayini için dondurularak saklanan miyokard homojenatından elde edilen süpernatantların 0.05 ml'si, Somogyi reaktifi (%10 ZnSO₄ ve 0,5 N NaOH) ile ¼ (v/v) oranında seyreltilerek ve deproteinize edilerek, + 4°C'de 1500

rpm de 10 dk santrifüj edildi (13). Elde edilen deproteinize süpernatantlardan NO (NO₂ + NO₃) tayini yapıldı.

Süpernatantda bulunan nitrat (NO₃) önce nitrite (NO₂) redüklendi ve sonra nitrit üzerinden hazırlanan nitrat standart grafiğinden miktar tayini yapıldı (14).

Histopatolojik inceleme için, Hemotoksilen-Eozin ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelendi. Histopatolojik değişikliklerin ağırlığına göre skorlama yapıldı. Aşağıda belirtilen her histopatolojik değişiklik için 1 puan verildi (15).

- Miyokard liflerinde şişme ve intertisiyel ödem (+1),
- Miyokard liflerinde disorganizasyonu (+1),
- Miyokard liflerinde nekroz (+1),
- Miyokard liflerinde vakuolizasyon (+1),
- Miyokard liflerinde hiçbir değişiklik yoksa (+0).

Kardiyomiyopati derecesinin ağırlığı, toplam puan (0 ile 3) göre yapıldı:

- 0 puan: kardiyomiyopati yok,
 - 1 puan: hafif derecede kardiyomiyopati,
- 2 puan: orta derecede kardiyomiyopati,

Tüm istatistiksel analizler SPSS 10.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Tüm parametreler istatistiksel analizlerde nonparametrik testler kullanıldığı için ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. Gruplar arası karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi ve Mann-Whitney U testi, grup içi karşılaştırmada ise Wilcoxon signed ranks testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde P<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi .

BULGULAR

Hipoksi grubunda hipoksi uygulamasını takip eden 6. günde troponin I, CKMB ve LDH düzeyleri artmış bulundu ve bu artma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$) (Tablo I). SOD ve GSH-PX düzeyleri 6. gün 0. gün değerine göre istatistiksel olarak anlamlı azalmış bulundu ($p<0.05$) (Tablo I).

Hipoksi grubunda sadece GSH-PX düzeyinde istatistiksel anlamlı azalma bulundu ($p<0.05$) (Tablo II). Diğer parametrelerin hiçbirinde anlamlı değişiklik saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo II).

Grupların doku NO düzeyleri karşılaştırıldığında; Hipoksi ve hipoksi+ melatonin grupları doku NO düzeylerinin, kontrol grubu doku NO düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artmış olduğu ($p<0.05$) tesbit edildi. Hipoksi+Melatonin grubunda NO düzeyi Hipoksi. grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalmış saptandı ($p<0.05$) (Tablo III).

Grupların doku SOD ve GSH-PX düzeyleri karşılaştırıldığında; gruplar arasında istatistiksel olarak

Tablo I. Hipoksi grubunda serum CKMB, LDH ve troponin I, plazma MDA, SOD, GSH-Px ve NO düzeyleri

	0. gün (n=9)	6.gün (n=9)	p değeri
	Ortanca (Min-Max)	Ortanca (Min-Max)	
Troponin I (ng/mL)	0.21(0.16-0.25)	0.32(0.22-0.41) ^a	<0.05
CKMB (U/I)	3857(939-8447)	5450(1288-7781) ^a	<0.05
LDH (IU)	660(603-984)	1276(765-8700) ^a	<0.05
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	0.360(0.288-1,232)	0.616(0.384-1.648)	>0.05
SOD (U/L)	1.023(0.929-1.411)	0,882(0.770-0,964) ^a	<0.05
GSH-PX (U/mL)	0.224(0.127-0,488)	0.122(0.096-0.154) ^a	<0.05
NO ($\mu\text{mol/L}$)	6,04(1.64-8,56)	7,52(0,00-10,50)	>0.05

Tablo II. Hipoksi+melatonin grubunda serum CKMB, LDH ve troponin I, plazma MDA, SOD, GSH-Px ve NO düzeyleri

	0. gün (n=9)	6.gün (n=9)	p değeri
	Ortanca (Min-Max)	Ortanca (Min-Max)	
Troponin I(ng/mL)	0.21(0.09-0.35)	0.18(0.14-0.24)	>0.05
CKMB (U/I)	4509(1755-10754)	3219(2297-9448)	>0.05
LDH (IU)	768(196-1373)	786(607-1702)	>0.05
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	0.520(0.240-0,768)	0.480(0.368-0.880)	>0.05
SOD (U/L)	0.929(0.788-1,140)	1,023(0.811-1,552)	>0.05
GSH-PX (U/mL)	0.190(0.079-1.608)	0.106(0.067-0.639) ^a	<0.05
NO ($\mu\text{mol/L}$)	6,40(0.64-9,80)	7,16(2,64-12,08)	>0.05

anlamli fark tespit edilmedi ($p>0.05$) (Tablo III).

Grupların doku MDA düzeyleri karşılaştırıldığında; Hipoksi, hipoksi.+melatonin grupları doku MDA düzeylerinin, kontrol grubu doku MDA düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artmış olduğu ($p<0.05$) tesbit edildi. Hipoksi grubu değeri hipoksi+melatonin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı ($p<0.05$) (Tablo III).

Grupların histopatolojik bulguları karşılaştırıldığında hipoksi grubu kardiyomiyopati skorunun diğer grupların kardiyomiyopati skoruna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Tablo IV).

TARTIŞMA

Tüm dünyada özellikle de ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde kardiyovasküler hastalıklar morbidite

Tablo III. Grupların doku GSH-Px, NO, SOD ve MDA düzeyleri

Grup	n	GSH-Px (mU/ μ g protein) Ortanca (Min-Max)	NO (μ mol $\times 10^{-3}$ / μ gprotein) Ortanca (Min-Max)	SOD (U/ μ g protein) Ortanca (MinMax)	MDA (nmol/ μ g protein) Ortanca (Min-Max)
Hipoksi	9	0.0039(0.0023-0,0043)	0.10 (0.05-0.15) ^a	4,96(2,68-6,96)	0.16(0.10-0,45) ^a
Hipoksi+Melatonin	9	0.0052(0.0023-0,0073)	0.081 (0.03-0.15) ^{a,b}	5,76(3,47-11,18)	0.12(0.03-0,17) ^{a,b}
Kontrol	7	0,0046(0,022-0,0055)	0.035 (0.017-0.077)	4,97(1,33-7,26)	0,031(0,007-0,12)

^a $p<0.05$, Kontrol grubu ile kıyaslandığında

^b $p<0.05$, Hip. grubu ile kıyaslandığında

Tablo IV. Grupların histopatolojik kardiyomiyopati skorlaması

Grup	n	Kardiyomiyopati Skoru(1-2-3)	Kardiyomiyopati Skoru(1-2-3)	Kardiyomiyopati Skoru(1-2-3)
		Hafif (%)	Orta (%)	Ağır (%)
Hipoksi	9	0	33	66 ^a
Hipoksi+Melatonin	9	33	22	44
Kontrol	7	0	0	0

^a $p<0.05$, Kontrol grubu ile kıyaslandığında

^b $p<0.05$, Hip. grubu ile kıyaslandığında

ve mortalitenin major sebebidir (16). Kardiyovasküler hastalıkların etyopatogenezinde oldukça önemli yer tutan myokardial iskemi / hipoksi hasarında erken tanı konularak uygun tedavi uygulandığında hayat kurtarıcı olunabilmektedir (3).

Jaffe ve arkadaşları (17) akut myokard infarktüsünde Troponin I'nın CK-MB'den daha duyarlı ve spesifik olduğunu, LDH artışının myokardiyal hasar için spesifik olmadığını, infarktüs sonrası 4. günden sonra Troponin I'nın sensitivitesinin %90 olduğunu rapor etmişlerdir. Chiu ve ark (18) myokard infarktüs sonrası erken saatte (4-8 saatte) CK-MB'nin sensitivitesini %92, Troponin I'nın geç saatlerde (8-72 saatte) sensitivitesini %93- bulmuşlar, bu markırların kombine kullanımının tanı için daha değerli olacağını rapor etmişlerdir. Vordenwinkler ve ark (19) izole perfüze rat kalbinde hipoksiyi takiben myokardiyal hasarda serum CK-MB, LDH, kardiyak troponin T ve kardiyak troponin I düzeylerinin birlikte yükseldiğini rapor etmişlerdir. Bazı çalışmacılar myokardiyal iskemiden sonra serum CK, LDH ve kardiyak troponin T'de ki artışların paralel olduğunu saptamışlar, regülatuar ve kontraktıl proteinlerin hücre içi farklı yerleşiminin salınım paternini etkilediğini rapor etmişlerdir (20-22)

Çalışmamızda hipoksi oluşturulan grupta çalışma sonu CKMB ve LDH düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanması literatürdeki çalışmalarla uyumlu bulunmuş, CKMB ve LDH düzeylerindeki yükselme gruplarda yeterli hipoksi ve myokardiyal hasar oluşturulduğunu düşündürmüştür. Melatonin uygulanan grupta, çalışma sonu serum CKMB ve LDH düzeylerinde artış tespit edilmemesi bu grupta belirgin myokardiyal hasarını önemli ölçüde önlediğini, muhtemel minör miyokardiyal hasarın tespitinde de serum CKMB ve LDH düzeylerinin yeterli olmadığını göstermektedir.

Hipoksi grubunda, Troponin I düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmış ve histopatolojik olarak ağır myokardiyal hasarın %66 bulunması ile yükselmiş serum troponin I düzeyleri arasında paralellik olduğu tespit edilmiştir.

Hipoksiye bağlı myokardiyal hasarlanmanın patogenezinde serbest radikallerin açığa çıkması ile lipid peroksidasyonunun başlaması ve antioksidan enzimlerin azalmasının major rol oynadığı bildirilmektedir (2). Ferrari ve arkadaşları (23) myokardiyal iskemi/reperfüzyon injurisinin, serbest oksijen radikalleri ve antioksidan defans mekanizması arasındaki hassas dengeye bağlı olduğunu ileri sürmüşler, izole tavşan kalbinde antioksidan N-asetil sistein verilmesi ile iskemiden sonra myokardiyal enzim salınımında gerileme, kardiyak kontraktılıte ve fonksiyonlarda iyileşme tespit etmişlerdir. Rao ve ark (24) myokardiyal iskemiden sonra doku MDA seviyelerinde artış tespit etmişlerdir.

Çalışmada melatonin verilen grupta doku MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre artma olmasına rağmen, hipoksi oluşturulan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi. Bu sonuç melatoninin antioksidan etkinliğini lipid peroksidasyonunu engelleyerek yaptığını düşündürmektedir.

Depre ve arkadaşları (25) tavşan kalbinde myokardiyal iskemiden sonra NO sentaz aktivitesinde artışa bağlı NO birikimi ve myokardiyal hasarda artış saptamışlardır. Wang ve arkadaşları (26) NO'nin kalpteki toksik etkisini; NO'nin süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucu peroksinitrit oluşması ile sağladığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda kalp doku NO düzeyi hipoksi grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Doku NO düzeyinin yüksek bulunması, hipoksiye bağlı myokardiyal hasarın patogenezinde NO'nin rolü olduğu görüşünü desteklemiştir. Melatonin verilen grupta doku NO düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek, hipoksi grubuna göre anlamlı düşük tespit edildi. Bu sonuçlar melatoninin NO sentezini azaltarak antioksidan aktivite sağlıyor olabileceği görüşünü desteklemektedir.

Kardiyomiyositleri serbest oksijen radikallerine karşı koruyan major antioksidan enzim GSH-Px'dır (2). Guarnieri ve arkadaşları (27) myokardiyal

iskemi/hipokside GSH-Px aktivitesinde azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Rao ve arkadaşları (24) köpek kalbinde 30 dk iskemiden sonra miyokardiyal GSH-Px aktivitesinde değişiklik saptamamış, 45 dk iskemiden sonra ise miyokardiyal GSH-Px aktivitesinde önemli derecede azalma saptamışlardır. Kihlström ve arkadaşları (28) rat kalbinde hipoksiden sonra GSH-Px aktivitesinde değişiklik olmadığını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda hipoksi oluşturulan grupta plazma GSH-Px düzeylerinin azalmış olduğu saptanmış, bu bulgu hipoksinin miyokardiyal hasar patogenezinde GSH-Px'in azalmasının primer rolü olduğu görüşünü desteklemiştir. Melatonin verilen grupta miyokardiyal GSH-Px aktivitesinde artma olmuş, ancak bu artma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bazı çalışmalarda miyokardiyal iskemi/hipoksiye bağlı kardiyak SOD aktivitesinde azalma olduğunu rapor edilmiştir (24,27). Arduini ve arkadaşları (29) rat kalbinde 60 dk iskemiden sonra SOD aktivitesinde değişiklik saptamadıklarını bildirmişler, bu farklılıkların iskeminin süresi ve derecesi ile ilişkili olabileceğini düşünmüşlerdir.

Çalışmamızda hipoksi oluşturulan grupta plazma SOD düzeyinde azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bulgularımız Rao (24) ve Guarnieri (27) ve ark'nın bulguları ile uyumludur. Melatonin grubunda artış hipoksi grubuna göre anlamlı idi. Bu bulgu melatonin etkinliğini plazma SOD düzeyini artırarak sağladığını düşündürdü.

Çalışmamızda hipoksi ile oluşturulan miyokardiyal hasar histopatolojik olarak da değerlendirilmiştir. Yuon ve arkadaşları (30) köpek kalbinde iskemiden sonra miyokard hücrelerinde ödem, disorganizasyon ve nekroz tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda hipoksi grubunda histopatolojik olarak miyokardiyal fibrillerde şişme, interstisiyel ödem, disorganizasyon ve nekrozdan oluşan bulguların olması ile ağır miyokardiyal hasar geliştiği saptanmıştır.

Melatonin verilen grupta histopatolojik değerlendirmede normal miyokard dokusu yanında, sadece

miyokardiyal fibrillerde şişme, interstisiyel ödem ve disorganizasyondan oluşan hafif ve orta kardiyomiyopati bulgusu saptanmış ve melatoninin hipoksiye bağlı kardiyak hasarlanmayı tam olarak önlemesede oldukça gerilettikleri düşünülmüştür.

Melatoninin toksik serbest radikalleri, peroksinitritleri, hidroksi radikalini, nitrik oksit ve metabolitlerini etkili bir şekilde temizlediği, lipid solubilitesi nedeniyle hücrel kompartmanlara kolaylıkla geçtiği, endojen antioksidan enzimleri GSH-Px, SOD, katalaz vb. stimüle ettiği bildirilmektedir (5,31). Kaneko ve arkadaşları (32) izole rat kalbinde melatoninin iskemiye bağlı ventriküler aritmi ve ventriküler fibrilasyon insidansını gerilettiğini rapor etmişler, bulgularını melatoninin hidroksi radikallerini temizlemesi ve lipid peroksidasyonunu azaltması ile açıklamışlardır. Gilad ve arkadaşları (33) melatoninin nitrik oksit ve süperoksitle reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitrite bağlı oksidan süreci inhibe ettiğini göstermişlerdir. Szarszo ve arkadaşları (34) melatoninin fizyolojik dozlarda etkili olmadığını, Sahn ve arkadaşları (35) ise melatoninin fizyolojik dozlarda ratlarda infarkt boyutunu gerilettiğini ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamızda farmakolojik dozda kullanılan melatoninin (10mg/kg), plazma SOD düzeylerinde anlamlı artma, doku MDA ve doku NO düzeylerinde anlamlı azalma sağlayarak antioksidan etki gösterdiği kanaatine varılmıştır. Melatonin verilen grupta GSH-Px ile ilgili bulgularımızın literatürden farklı olmasının; melatoninin uygulama kullanma dozu, süresi ve antioksidan enzimlerin ölçülme zamanı gibi faktörlerden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, hipoksiye bağlı miyokardiyal hasarın patogenezinde miyokardiyal antioksidan enzimlerde azalmanın, serbest radikallerde ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artmanın rol oynayabileceği; melatoninin antioksidan etkinlik sağlayarak hipoksiye bağlı kardiyak hasarı önleyebileceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. Haider KH, Stimson WH. Cardiac myofibrillar proteins: biochemical markers to estimate myocardial injury. *Mol Cell Biochem* 1999,194:31-39.
2. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.*2000,47:446-456.
3. Das UN. Free radicals , cytokines and nitric oxide in cardiac failure and myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 2000,215:145-152.
4. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev.* 1994;52:253-265.
5. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* 2000,7:444-458.
6. Reiter RJ, Carnerio RC. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997,29:363-372.
7. Duncker DJ, Verdouw PD. Has melatonin a future as a cardioprotective agent? *Cardiovasc Drugs Ther* 2001,15:205-207.
8. Rumsey WL, Abbott B, Bertelsen D et al. Adaptation to hypoxia alters energy metabolism in rat heart. *Am J Physiol* 1999,276:71-80.
9. Paglia DE, Valentina WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967,70:158-169.
10. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988,3413:497-500.
11. Jain SK. Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochem Biophys Acta* 1988,937:205-210.
12. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid relations. *Analytical Biochemistry* 1979, 95:351-358.
13. Davidge ST, Stranko CP, Roberts JM. Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996,174:1008-1013.
14. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995,41:892-896.
15. Morishima I, Matsui H, Mukawa H, Hayashi K, Toki Y, Okumura K, Ito T, Hayakawa T. Melatonin, a pineal hormone with antioxidant property, protects against adriamycin cardiomyopathy in rats. *Life Sci* 1998,63:511-521.
16. Foex P. Myocardial ischaemia. *Clin Anaesth* 1999,13:321-334.
17. Jaffe AS, Landt Y, Parvin CA, et al. Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. *Clinical Chemistry* 1996, 42:1770-1776.
18. Chiu A, Chan WK, Cheng SH, Leung CK, Choi CH. Troponin-I, myoglobin, and mass concentration of creatine kinase-MB in acute myocardial infarction. *J Med* 1999,92: 711-718.
19. Vorderwinkler KP, Mair J, Puschendorf B, Hempel A, Schlüter K.D, Piper H.M. Cardiac troponin I increases in parallel to cardiac troponin T ,creatine kinase and lactate dehydrogenase in effluents from isolated perfused rat hearts after hypoxia-reoxygenation-induced myocardial injury. *Clinica Chimica Acta* 1996,251:113-117.X
20. Remppis A, Scheffold T, Greten J et al. Intracellular compartmentation of troponin T: release kinetics after global ischemia and calcium paradox in the isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995,27: 793-803.

21. Asayama J, Yamahara Y, Otha B, et al. Release kinetics of cardiac troponin T in coronary effluent from isolated rat hearts during hypoxia and reoxygenation. *Basic Res Cardiol* 1992,87:428-436.
22. Bleier J, Vorderwinkler KP, Falkensammer J et al. Different intracellular compartmentations of cardiac troponins and myosin heavy chains: a causal connection to their different early release after myocardial damage. *Clin Chem* 1998,44(9):1912-1918.
23. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, et al. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *J Clin Nutr* 1991,53: 215-222.
24. Rao PS, Cohen MV, Mueller HS. Production of free radicals and lipid peroxides in early experimental myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1983,15:713-716.
25. Depre C, Fierain L, Hue L. Activation of nitric oxide synthase by ischaemia in the perfused heart. *Cardiovasc Res* 1997,33: 82-87.
26. Wang PH, Zweier JL. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart: evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem* 1996,271: 29223-29230.
27. Guarnieri C, Flamigni F, Caldarera CM. Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart. *J Mol Cell Cardiol* 1980,12: 797-808.
28. Kihlström M, Kainulainen H, Salminen A. Enzymatic and nonenzymatic lipid peroxidation capacities and antioxidants in hypoxic and reoxygenated rat myocardium. *Exp Mol Pathol* 1989;50:230-238.
29. Arduini A, Mezzetti A, Porreca E et al. Effect of ischemia and reperfusion on antioxidant enzymes and mitochondrial inner membrane proteins in perfused rat heart. *Biochim Biophys Acta* 1988,970:113-121.
30. Yuan SM. Cytochemistry and ultrastructure of canine myocardium undergoing global ischemia and reperfusion injury. *J Med Sci* 1999,15(1):1-7.
31. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997,60:2255-2271
32. Kaneko S, Okumuro K, Numaguchi Y, et al. Melatonin scavenges hydroxyl radical and protects isolated rat heart from ischemic reperfusion injury. *Life Sci* 2000,67:101-112.
33. Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. *Life Sci* 1997,60:169-174.
34. Szarszoi O, Asemu G, Vanecek J, Ostadal B, Kolar F. Effects of melatonin on ischemia and reperfusion injury of the rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001,15: 251-257.
35. Sahna E, Acet A, Ozer MK, Olmez E. Myocardial ischemia-reperfusion in rats: reduction of infarct size by either supplemental physiological or pharmacological doses of melatonin. *J Pineal Res* 2002,33: 234-238.