

İNTRAPERİTONEAL MELATONİN ENJEKSİYONU VE PİNEALEKTOMİNİN DENEYSSEL AKUT PANKREATİTE ETKİSİ

THE EFFECTS OF INTRAPERITONEAL MELATONIN INJECTION AND PINEALECTOMY IN EXPERIMENTAL ACUTE PANCREATITIS

Kahraman DİNLER*, Ahmet Oğuz HASDEMİR*, Cavit ÇÖL*, Bülent GÜNDÜZ**,
Güler BUĞDAYCI***, Aysel KÜKNER****

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada deneysel olarak akut pankreatit oluşturulan ratlarda, kandaki melatonin düzeyinin azaltılması veya artırılmasının pankreas dokusunda neden olduğu histopatolojik değişiklikler ve bazı biyokimyasal belirteçlere etkisinin değerlendirilmesini amaçladık.

Gereç ve yöntem: Bu çalışma deneysel akut pankreatit oluşturulan ve her grupta 10 hayvan bulunan 3 grup Winstar Albino cinsi sıçan üzerinde yürütüldü. Birinci grup denekler kontrol grubu olarak değerlendirildi. İkinci grup deneklerde pinealektomi yapılarak temel endojen melatonin kaynağı ortadan kaldırıldı (düşük melatonin düzeyli grup). Bir hafta boyunca günde 20 mg/ml melatonin solusyonundan 0,1 ml intraperitoneal enjeksiyon yapılan üçüncü gruptaki ratlar ise yüksek melatonin düzeyli grubu oluşturmuştur. Bu gruplar akut pankreatitin biyokimyasal parametreleri ve histopatolojik bulguları açısından karşılaştırılarak melatonin düzeyinin akut pankreatite etkisi araştırılmıştır. Gruplar pankreas dokusunda polimorf nükleer lökosit infiltrasyonu, ödem, hemoraji, asiner hücre dejenerasyonu ve apoptozis gibi histopatolojik değişiklikler, malonildialdehid (MDA), glutatyon (GSH) ve superoksid dismutaz (SOD) düzeyleri, biyokimyasal olarak serum aspartat transaminaz (AST), alanin transferaz (ALT), amilaz, laktat dehidrogenaz (LDH) ve bilirubin değerlerindeki değişiklikler açısından karşılaştırıldı.

Bulgular: Yüksek melatonin düzeyinin pankreas dokusunda polimorf nükleer hücre infiltrasyonunu, ödem, hemoraji, asiner hücre dejenerasyonu, apoptozis, AST, LDH, amilaz, bilirubin ve doku MDA düzeyini azaltıcı etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak ekzojen melatonin verilmesinin, pankreasta oksidatif hasarı azaltmak suretiyle dokudaki inflamatuvar reaksiyonları kısmen önleyici bir etkiye sahip olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Akut Pankreatit, melatonin, pinealektomi

ABSTRACT

Objectives: In this study the aim was to evaluate the effects of on biochemical markers and histopathological findings of pancreas tissue of decreasing and increasing serum melatonin levels in rats with had experimental acute pancreatitis.

Materials and methods: This study was conducted three groups of Winstar Albino rats (ten animals in every group) that have experimental acute pancreatitis. First group was evaluated as control group. Surgical pinealectomy was applied in the second group and the source of endogen melatonin was (low melatonin levels group). Third group of rats injected with 0.1 ml daily intraperitoneal injection of 20 mg/ml melatonin solution for one week was high melatonin levels group. The effects of melatonin levels on acute pancreatitis were evaluated by comparing these group according to histopathological results of polymorphonuclear leukocytes. infiltration, oedema, haemorrhage, apoptosis, aciner cellular degeneration in pancreatic tissue and the levels of malonyledialdehyde (MDA), glutathione reductase (GSH), superoxyde dismutase (SOD), aspartate transaminase (AST), alanine transpherase (ALT), amylase, lactate dehydrogenase (LDH) and bilirubine.

Date received/Dergiye geldiği tarih: 24.02.2009 Dergiye kabul edildiği tarih: 03.06.2009

* Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilimdalı, Bolu

** Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bolu

*** Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilimdalı, Bolu

**** Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilimdalı, Bolu

Results: We investigated that high melatonin levels has an decreasing effect on of polimorphonuclear leukocyte infiltration, oedema, haemorrhage, aciner cellular degeneration, apoptosis in pancreatic tissue, AST, LDH, bilirubine and MDA levels. **Conclusion:** As a conclusion exogenous melatonin may have a preventive effect on inflammatory process by reducing oxidative damage in pancreatic tissue.

Key words: Acute pancreatitis, melatonin, pinealectomy

GİRİŞ

Akut pankreatit, pankreasta perivasküler infiltrasyon ve inflamasyonla birlikte yağ nekrozu, polimorf çekirdekli lökosit (PMNL) infiltrasyonu, hemoraji, asiner hücre nekrozu ve doku ödemi ile karakterize bir hastalık olup, tanı ve tedavisindeki güçlükler nedeniyle günümüzde Genel Cerrahi Kliniklerinin önemli hastalıklarından birisidir (1,13). Akut pankreatitler genellikle hafif ve kendini sınırlayan bir tablo şeklinde seyretmekle birlikte, zaman zaman karşımıza çıkan nekrotizan akut pankreatitler; modern yoğun bakım teknikleri, gelişmiş nutrisyonel destek uygulamaları, sıvı-elektrolit replasmanları ve mekanik ventilasyon olanaklarına rağmen %6,2-20,8 gibi yüksek mortalite oranlarıyla seyretmektedirler (1). Bu nedenle akut pankreatitlerin tanı ve tedavisiyle ilgili yapılan araştırmalar günümüzde de önemini korumakta ve bu konuda elde edilen gelişmeler klinik uygulamalara çok değerli katkılarda bulunmaktadır.

Akut pankreatitte lokal inflamasyonun şiddeti ve sistemik komplikasyonlar, sitokinlerin ve PMNL fonksiyonlarının artış yönünde düzenlenmesi, pankreastaki asiner hücre dejenerasyonunun oranı ve bakteriyel kontaminasyonun gelişip gelişmediğiyle ilişkilidir (3,14). Akut pankreatitin erken ve geç dönemlerinde aktif rol oynayan reaktif O₂ radikalleri lipid ve proteinlerin üzerinde direkt etkiyle hücre membranı ve fonksiyonlarında bozulmaya, lizozomal enzimlerin serbestleşmesiyle pankreas hücrelerinde hasara yol açar (3,4). Pankreas sekresyonlarının interstisyel alana ekstrasvazasyonu sonrasında proteolitik enzimler aktive olarak dokunun kendi kendini sindirme süreci başlatılmış olur. Dokuda ödem, mikro dolaşımda bozulma ve hücre düzeyinde iskemi gelişir. Bu da inflamasyonun derinleşmesine ve toksik mediyatörlerin dokuda birikmesine, akciğer, böbrek ve karaciğerde fonksiyon bozukluklarına, artmış metabolik aktivite ve bir dizi diğer fizyopatolojik olaylar sonucunda çoklu organ yetmezliği sendromuna (MOF) yol açar (1,2,3).

Melatonin, immun sistem üzerine hücreselel immunitiyi hem direkt hem de indirek yollarla etkileyen bir hormondur. Pineal bezdeki pinealosit hücrelerinden ritmik olarak sentezlenen ve salınan melatonin, lipofilik ve hidrofilik özellikleri olması nedeniyle vücuttaki bütün morfofizyolojik bariyerleri geçerek her organdaki intersellüler alana ve hücre çekirdeğine kolayca ulaşabilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda melatoninin serbest radikalleri tutucu etkisi ve yüksek antioksidan etkisi olduğu gösterilmiştir. Melatonin reseptörlerden bağımsız olarak toksik radikaller üzerine etki göstererek; yüksek toksik hidroksil, peroksil radikali, serbest O₂ radikali ve peroksinitrit anyonu gibi birçok serbest radikali parçalayabilmekte ve kuvvetli antioksidan etki göstermektedir. Buna ek olarak, melatoninin genomdaki reseptörleri etkileyerek Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GPx) ve Glutasyon Re-

düktaz (GRx) gibi antioksidan enzim sistemlerini uyarıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir. Melatonin bu etkileriyle hücreleri oksidatif hasardan korumakta, dokuda inflamasyonu azaltmakta ve doku ödemi geriletmektedir (7). Bu nedenle pineal bez ve melatoninin antioksidan etkisi ve immun fonksiyonlarla ilişkisi birçok araştırmannın konusu olmuştur.

Ancak melatoninin akut pankreatit fizyopatolojisindeki olumlu ya da olumsuz etkisi literatürde pek az çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışmaların hiç birinde pinealektomi yapılmamış, yani organizmanın esas melatonin kaynağı ortadan kaldırılmamıştır. Biz bu çalışmada, normal endojen melatonin salgısı devam eden sıçanlarla, pinealektomi yapılarak endojen melatonin salgısı ortadan kaldırılan ratlarda akut pankreatit modeli oluşturarak düşük ve yüksek melatonin düzeyinin akut pankreatit fizyopatolojisi üzerine etkilerini gözlemlemeyi amaçladık. Bu amaca yönelik olarak, deneysel akut pankreatit gerçekleştirilen sıçanlarda melatoninin yoksunlaştırılmış düşük melatonin düzeyli grup, normal melatonin düzeyli grup ve yüksek melatonin düzeyli gruplardaki biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler saptanarak gruplar arasındaki farklı bulgular istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Yapılan deneysel çalışma, İzzet Baysal Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul onayı alınarak 30 adet Winstar Albino cinsi (200-250gr) erişkin erkek sıçan üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda her biri 10 sıçandan oluşan toplam 3 grup oluşturulmuştur. Tüm denekler 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda normal oda sıcaklığında (22°C) tutulmuş, standart palet sıçan yemi (210kcal/100gr/gün) ile beslenmiş ve musluk suyu içmişlerdir. Cerrahi girişim sonrası laparotomiler ve kraniotomiler kapatılarak günlük yara bakımları yapılmış, aynı ortamda beslenme rejimleri devam ettirilmiştir.

Birinci gruptaki sıçanlarda (n=10) sadece deneysel akut pankreatit modeli gerçekleştirilmiş, başka herhangi bir cerrahi (pinealektomi) veya medikal girişim (melatonin enjeksiyonu) uygulanmamış bu gruptaki denekler diğer çalışma gruplarının kontrol grubu olarak kullanılmıştır. İkinci gruptaki sıçanlarda (n=10) akut pankreatitle aynı gün pinealektomi yapılmış, melatonin tedavisi uygulanmamıştır. Üçüncü grupta (n=10) ise akut pankreatit oluşturulduktan sonra 7 gün süreyle 20 mg/ml melatonin solusyonundan her gün 0,1 ml intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. İkinci ve üçüncü grup sıçanların verileri kontrol grubu verileriyle karşılaştırılmıştır.

Cerrahi Teknik

Deney hayvanlarına uygulanan bu cerrahi ve tıbbi girişimler genel anestezi altında ve standart steril koşullarda gerçekleştirilmiştir. Genel anestezi 20 mg/kg dozda Ketamin HCl (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul) ve 5 mg/kg Xylazine HCl (Alphazin amp) intramuskuler ile enfeksiyon profilaksisi 2,5 mg/kg En-

rofloksasin (Baytril % 10, Bayer- İstanbul) ile yapılmıştır. Akut pankreatit; orta hattan yapılan yaklaşık 2 cm'lik laparotomi ile ortak kanal bağlanarak gerçekleştirilmiştir.

Birinci gruptaki deneklerde başka bir girişim yapılmazken ikinci gruptaki deneklerde akut pankreatit modeliyle birlikte, aynı seansta Hoffman ve Reiter tekniğiyle pinealektomi yapılmıştır (16). Üçüncü gruptaki deneklere akut pankreatit modeli gerçekleştirildikten 24 saat sonra 7 gün boyunca hergün akşam 18.00-20.00 saatleri arasında Melatonin (Sigma, St.Louis, MO, USA) 20 mg/ml solusyonunda 0,1 ml intraperitoneal olarak verilmiştir. Kullanılan bu doz yaklaşık 250 g ağırlığındaki bir Winstar Albino cinsi sıçan'ın pineal bezinden salıverilen bir gecelik dozu karşılayabilecek fizyolojik sınırlardaki doz olup böylece organizmadaki melatonin düzeyinin birinci gruptaki sıçanların iki katına çıkartıldığı kabul edilmiştir. Çalışma süresi içinde Grup I'de bir denek, Grup II'de 2 denek, grup III'de ise 3 denek çeşitli teknik komplikasyonlar ve anesteziye bağlı nedenlerle öldüğü için çalışma dışı kalmıştır. Böylece I. Grupta 9, II. Grupta 8, III. Grupta 7 denek ile çalışma tamamlanmıştır.

Histopatolojik İnceleme

Akut pankreatit modeli gerçekleştirildikten sonra 7.gün denekler yeniden anestetize edilerek re-laparotomi yapılmış, histopatolojik inceleme için pankreas doku örneği alınmıştır. Örnekler %10'luk formaldehitde 48 saat fiksasyon ve dereceli etil alkol serilerinden geçirilerek xylol ile şeffaflandırılmış ve parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilin-Eozin (HE) ile boyanmış ve doku kesitleri ışık mikroskopunda incelenmiştir. Pankreatik dokuda PMNL infiltrasyonu ödem, hemoraji ve asiner hücre dejenerasyonu derecesi değerlendirilerek aşağıda belirtilen histolojik skorlamalar yapılmıştır (31).

Pankreasta PMNL infiltrasyonu için kullanılan skorlama yöntemine göre; hiç lökosit infiltrasyonu yok ise [0], perivaskuler alanda hafif derecede lökosit infiltrasyonu var ise (1), perivaskuler alanda orta derecede lökosit infiltrasyonu var ise (2) tüm sahalarda şiddetli ve yaygın lökosit infiltrasyonu var ise (3) puan ile skorlanmıştır.

Pankreatik ödem için kullanılan skorlama yöntemine göre; pankreasta hiç ödem yok ise (0), interlobuler ödem mevcut ise (1), interlobuler ödem ve hafif intralobuler ödem mevcut ise (2), interlobuler ödem ve şiddetli intralobuler ödem mevcut ise (3) puan ile skorlanmıştır.

Pankreatik hemoraji için kullanılan skorlama yöntemine göre; pankreasta hiç hemoraji yok ise (0), pankreasta her kesitte 1-2 hemorajik alan mevcut ise (1), pankreasta her kesitte 3-5 hemorajik alan mevcut ise (2), pankreasta her kesitte 5'den fazla hemorajik alan mevcut ise (3) puan ile skorlanmıştır.

Pankreasta asiner hücre dejenerasyonu için kullanılan skorlama yöntemine göre; pankreasta hiç asiner hücre dejenerasyonu yok ise (0), pankreasta her kesitte %15'den az hücrede asiner hücre dejenerasyonu var ise (1), pankreasta %15-35 oranda asiner hücre dejenerasyonu var ise (2), pankreasta %35'den fazla asiner hücre dejenerasyonu var ise (3) puan ile skorlanmıştır.

Pankreasta asiner hücrelerdeki apoptoz değerlendirmesi için kullanılan skorlama yöntemine göre her bir deneğe ait doku

kesitinde 10 alanda, X40 objektif büyütme ile apoptotik cisimcikleri belirgin olan hücreler sayıldı ve her alanda apoptoz görülen asiner hücreler yüzdelik dilimler halinde değerlendirildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırılarak gruplar arasında istatistiksel anlamlılık olup olmadığı araştırıldı.

Biyokimyasal Ölçümler

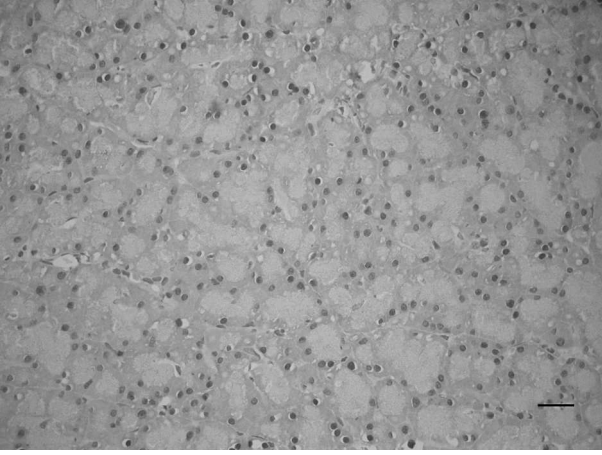
Sıçan Serumlarında Yapılan Ölçümler: Çalışmanın 7.günü sonunda denekler sakrifiye edilmeden hemen önce deneklerden intrakardiyak olarak 2 cc kan alınmış ve Aspartat Transaminaz (AST), Alanin Transaminaz (ALT), Amilaz, Laktat Dehidrogenaz (LDH), Total ve Direkt Billirubin çalışılmıştır. Deneklerden elde edilen kan örnekleri antikoagülan içermeyen katkısız biyokimya tüplerine (Becton Dickinson, New Jersey, USA) konmuştur. Yaklaşık 20 dakika dinlendirildikten sonra 3500Xg'de 15 dakika santrifüj edilerek ayrılan serumda 1/5 serum fizyolojik kullanılarak dilüsyon yapıldıktan sonra AST, ALT, Amilaz, LDH, Total ve Direkt Bilurubin otoanalizörde (Abbott Architect C8000, Chicago, IL, USA) çalışılmıştır. Sonuçlar enzimlerde aktivite, bilirubinlerde mg/dl olarak verilmiştir.

Biyokimyasal Doku Deneyleri: Pankreatik doku alındıktan sonra soğuk serum fizyolojikle yıkanmış ve inceleme gününe kadar -70 °C de derin dondurucuda saklanmıştır. Daha sonra 200 mg yaş doku ve 1.8 ml Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.4) içinde (1/9; ağırlık/volüm) + 4 °C'de teflon uçlu homojenizatör kullanılarak (IKA Ultra Turrax T 8, IKA Labor-technic, Staufen, Germany) 16 000 rpm'de 3 dakika homojenize edildi. Bu karışım 4000 g'de 20 dakika + 4 °C de santrifüj edilmiştir. Süpernatant ayrılarak doku proteini, MDA, GSH ve SOD deneyleri için kullanılmış, doku proteini Lowry metodu ile ölçülmüştür (25).

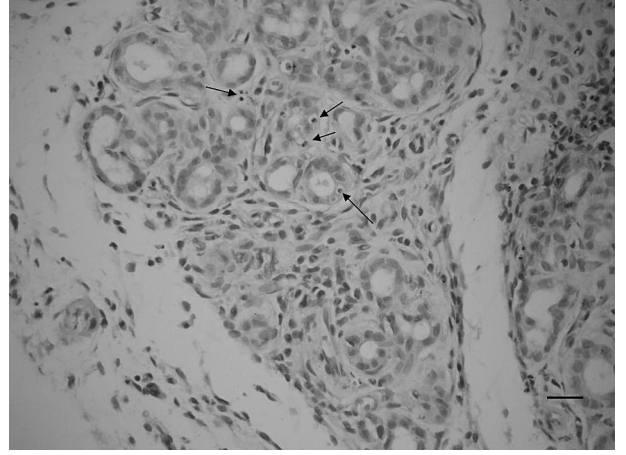
Malonildialdehid (MDA) Düzey Ölçümü: Dokuda MDA düzeyi tiobarbitürik asit kaynatmalı metodu kullanılarak ölçülmüştür. Triklorasetik asit ile presipite edilen örnekler tiobarbitürik asit ve n-butanol eklenerek 532 nm'de spektrofotometrik olarak (Digilab Hitachi U-2800, Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan) analiz edilmiş, sonuçlar nmol MDA/mg yaş doku ağırlığı olarak verilmiştir (12).

Redükte Glutasyon (GSH) Düzey Ölçümü: GSH, Elman Reaktifi 5,5'- Dithiobis "2-nitrobenzoik asit"-DTNB; D8130, (Sigma-Aldrich- Sigma Chemical, St.Louis, Mo, USA) kullanılarak ölçülmüştür. Deneye başlarken Na₂HPO₄.2H₂O solüsyona süpernatant eklendikten sonra karışıma Elman reaktifi eklenmiş, karışım bekletilmeden 412 nm spektrofotometre'de (Digilab Hitachi U-2800, Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan) okutulmuştur. Sonuçlar nmol GSH/mg yaş doku ağırlığı olarak verilmiştir (4).

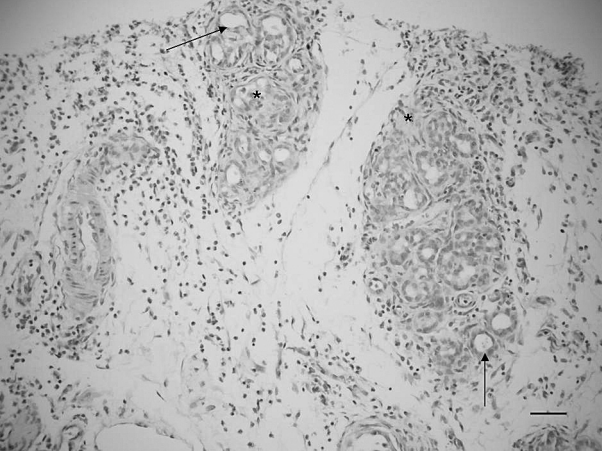
Superoksid dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü: SOD aktivitesinin ölçümü, ksantin oksidaz ve hipoksantin oluşturduğu serbest radikallerin saptanmasında tetrazolium tuzlarının oluşumu esasına dayanan hazır ticari kolorimetrik kitler kullanılarak yapılmıştır (Cayman Chemical Company, Katalog No: 7006002, Ann Arbor, USA). Reaksiyonların oluştuğu kolorimetrik plak BioRAD Benchmark Plus ELISA okuyucu ile 450 nm'de ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisinde belirlenen regresyon ve her örnek için kullanılan lineerize hız kullanılarak



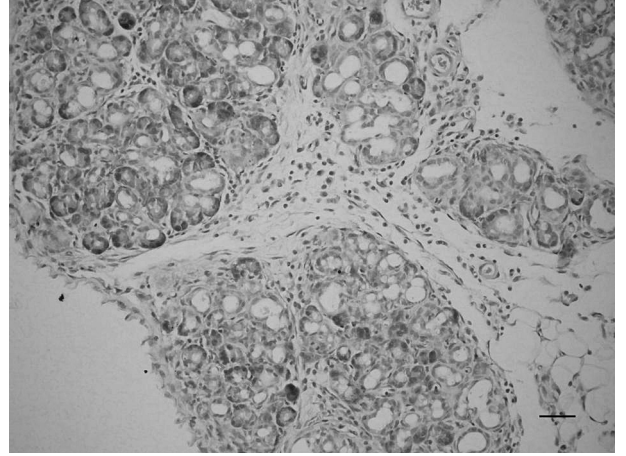
Resim 1. Normal sağlıklı sıçanlarda pankreas dokusunun ışık mikroskopik görünümü (HE. Bar 50 µm)



Resim 3. Akut pankreatitli I grup deneklerde asinuslarda genişleme ve çok sayıda apoptotik cisimciğin görünümü (HE. Bar 50 µm)



Resim 2. Akut pankreatitli kontrol grubu deneklerde PMNL artışı, ödem, duktal transformasyonlar (□) ve asinus arasında dejenere alanlar (*) görülmektedir. (HE. Bar 100 µm)



Resim 4. Pankreatit+Pinealektomi yapılan Grup II deneklerde pankreas histolojik görünümü Grup I'e benzemektedir (HE. Bar 100 µm)

aktivite tanımı yapılmış ve sonuçlar U/mg yaş doku ağırlığı olarak verilmiştir (29).

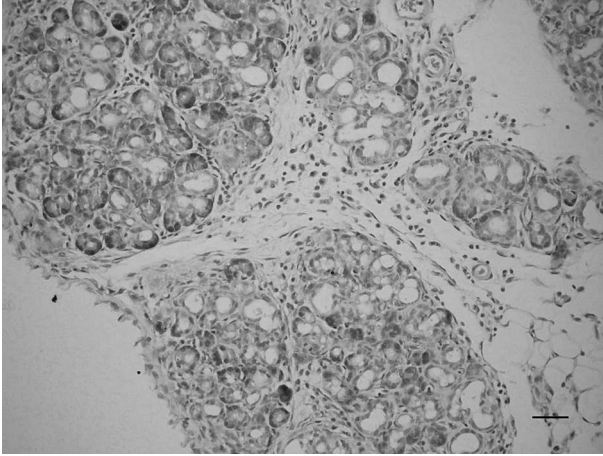
İstatiksel Analiz; SPSS for Windows 10.0 istatistik paket programı uygulanarak istatistiksel karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi kullanılmıştır, $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Histopatolojik İnceleme Sonuçları; Deneklerin pankreas dokularındaki PMNL infiltrasyonu, ödem ve hemoraji değerlendirilmesi için yapılan skorlama sonuçları değerlendirildiğinde, PMNL infiltrasyonu, ödem ve hemoraji skorları kontrol grubu ve pinealektomi grubunda yüksek olduğu halde melatonin verilen grupta skorların belirgin olarak düştüğü gözlenmiştir. PMNL infiltrasyon skorları bakımından gruplar değerlendirildiğinde kontrol grubundaki PMNL infiltrasyon skorunun $2,44 \pm 0,88$ iken melatonin verilen deneklerde $1,22 \pm 0,83$ 'e düştüğü ve ortalama %50 oranında azaldığı saptanmıştır. Kontrol grubu deneklerde ödem skor ortalaması $1,55 \pm 0,52$,

pinealektomi yapılan grupta $1,37 \pm 0,51$ olduğu halde melatonin verilen III. gruptaki sıçanlarda pankreas dokusundaki ödem skor ortalamasının da istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düştüğü ve $1,0 \pm 0,7$ düzeyinde olduğu saptanmıştır. ($t: 2,24$, $p=0,036$).

Normal sıçanların pankreas kesitleri (Resim 1) ile karşılaştırıldığında akut pankreatit oluşturulan deneklerde pankreas asinus lümenlerinin çok genişleyerek duktal transformasyon oluşturduğu ve lobüller arasında az sayıda hemorajik alanlar olduğu görülmektedir (Resim 2 ve Resim 3). Asiner hücre dejenerasyonu skorları ve apoptoza giden hücre yoğunluğu açısından gruplar karşılaştırıldığında kontrol grubu ve pinealektomi grubunun tersine melatonin verilen grupta hiç asiner hücre dejenerasyonunun olmadığı saptanmıştır (Resim 4 ve Resim 5). Asiner hücre dejenerasyonu açısından gruplar arasındaki skor farkı çok belirgin olup birinci ve ikinci gruplarda bu skorlar ortalama 0,77 ve 0,37 bulunmuştur. Benzer şekilde asiner hücrelerde apoptoz görülmesi yönünden de melatonin verilen grup ile diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel ola-



Resim 5. Melatonin tedavisi uygulanan gruptaki deneklerde ödem ve inflamasyonun belirgin olarak azaldığı, yer yer asiner genişlemelerin devam ettiği görülmektedir (HE. Bar 50 µm)

rak anlamlı düzeyde bulunmuş, kontrol grubu deneklerde çok yüksek ($30,55 \pm 11,5$) olan apoptoz skoru melatonin tedavisi uygulanan deneklerde $12,77 \pm 8,4$ 'e inmiştir ($t:3,72$, $p=0,002$). Akut pankreatitli sıçanlarda nötrofillerin baskın olduğu lökosit artışı, lobüllerde dejenere alanlar, aşırı dilate olmuş asinus

lümenlerinde yassılaştırmış epitel hücreleri görülmüştür (Resim 2). Ödem ve PMNL infiltrasyonu nedeniyle genişlemenin çok fazla olduğu asinuslarda epitel yer yer yassılaştırmıştır. Bu gruptaki deneklerin bazılarında asinuslar arasında hücre dejenerasyonu olan alanlar saptanmıştır. Bazı deneklerde pankreas dokusunda ileri derecedeki ödeme bağlı olarak Resim 3'de görüldüğü gibi Langerhans adacıklarının izole olduğu, asinuslardan ayrıldığı, ancak genel olarak yapısal bir bozulmanın olmadığı ancak asiner hücrelerde artmış apoptotik cisimcikler olduğu izlenmiştir.

Biyokimyasal İnceleme Sonuçları: Serum örneklerinden elde edilen AST, ALT, Amilaz ve LDH enzim düzeyleri Tablo 1'de, Total bilirubin, indirekt bilirubin ve direkt bilirubin düzeyleri Tablo 2'de, doku örneklerinden elde edilen MDA, GSH ve SOD düzeyleri ise Tablo 3'de gösterilmiştir.

Grup I'deki kontrol grubu sıçanlar ile diğer gruplar AST, ALT, Amilaz ve LDH enzim düzeyleri açısından karşılaştırıldığında AST değerlerinde melatonin tedavisi sonrası düşme olurken ALT düzeylerinde artma olduğu saptanmıştır. AST düzeylerinde tespit edilen düşme istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Grup I ile Grup III arasındaki fark için ($t:3,52$, $p=0,003$), Grup II ile Grup III arasındaki fark için ($t:3,91$, $p=0,001$) bulunmuştur. Serum ALT değerleri akut pankreatit geliştirilen kontrol grubu sıçanlarda ortalama $222,6$ U/L düzeyinde bulunurken melatonin tedavisi uygulanan grupta iki ka-

Tablo 1. Akut pankreatitli deneklerde AST, ALT, Amilaz, LDH enzim düzeyleri

	AST (U/L)	ALT (U/L)	Amilaz (U/L)	LDH (U/L)
Grup I	618,11±42,60	222,66±55,0	946,55±18,23	413,55±18,63
Grup II	520,25±30,81	219,37±95,6	2381,75±123,6	597,87±21,84
Grup III	114,66±47,7	520,55±30,76	357,55±17,7	292,55±16,98

(AST: Aspartat Transaminaz, ALT: Alanin Transaminaz, LDH: Laktat Dehidrogenaz)

Tablo 2. Deneysel obstruktif pankreatit modeli oluşturulan deneklerde serum bilirubin düzeylerinin gruplara göre dağılımı

	Total Bilirubin (mg/dl)	İndirekt Bilirubin (mg/dl)	Direkt Bilirubin (mg/dl)
Grup I	13,83±1,9	4,06±2,1	9,77±2,3
Grup II	18,18±3,7	6,94±3,5	11,24±3,4
Grup III	5,67±2,4	2,57±1,6	3,10±1,1

Tablo 3. Akut pankreatitli deneklerde MDA, GSH ve SOD düzeyleri

	MDA (nmol/mg)	GSH (nmol/mg)	SOD (U/mg)
Grup I	2,92±0,29	2,52±0,27	26,61±3,39
Grup II	4,45±0,81	1,72±0,19	21,51±2,22
Grup III	2,11±0,17	2,87±0,19	29,92±2,39

tını geçecek şekilde arttığı ve $520,55 \pm 30,76$ U/L olduğu tespit edilmiştir (t:2,86, p=0,011).

Amilaz düzeyi akut pankreatitli kontrol grubunda $946,5$ U/L ortalama değere ulaşmış, pinealektomi eklenen düşük melatonin düzeyli grupta ise daha yüksek değerlere ulaşarak $2381,75 \pm 123,6$ U/L olmuştur. Melatonin tedavisi uygulanan deneklerde ise belirgin bir düşüş olduğu $357,55 \pm 17,7$ U/L düzeyine indiği saptanmıştır. Grup I ve Grup II arasındaki amilaz değerindeki artış yönünden yapılan istatistiksel analizde (t:3,4, p=0,004), Grup I ile Grup III arasındaki amilaz değerlerinin azalışı yönünden yapılan istatistiksel analizde ise (t:6,95, p=0,00) bulunmuştur.

LDH enzim düzeyleri yönünden gruplar karşılaştırıldığında amilaz değerlerindeki değişikliğe paralel bir durum saptanmış akut pankreatitli kontrol grubu deneklerde LDH düzeyleri yükselerek $413,55 \pm 18,63$ U/L'ye ulaşmış, pinealektomi eklenen grupta LDH yükselmesi daha da belirginleşerek $597,87 \pm 21,84$ U/L düzeyine çıkmış, melatonin tedavisiyle LDH düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşme sağlanmış ve bu grupta ortalama LDH düzeyi $292,55 \pm 16,98$ U/L olarak tespit edilmiştir (t:3,23, p=0,006).

Akut pankreatit modeli gerçekleştirilen deneklerde serum bilirubin değerlerine bakıldığında kontrol grubunda direkt bilirubin için ortalama değer $9,77$ mg/dL, indirekt bilirubin $4,06$ mg/dL, total bilirubin ise $13,83$ mg/dL bulunmuştur. Tablo 2'de görüldüğü gibi akut pankreatit prosedürüne pinealektomi eklenmesinin serum bilirubin değerini daha da yükselttiği, melatonin verilmesinin ise hiperbilirubinemiye azalttığı gösterilmiştir. Bilirubin düzeyleri açısından gruplar karşılaştırıldığında Grup I ile Grup II arasında, Grup I ile Grup III arasında, Grup II ile Grup III arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık olduğu saptanmıştır. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre; Grup I ve Grup II için (t:3,06, p=0,008), Grup I ve Grup III için (t:7,82, p=0,00), Grup II ve Grup III için (t:8,26, p=0,002) olarak saptanmıştır.

Akut pankreatit modeli uygulanan deneklerde doku örneklerinde oksidatif stresin göstergeleri olan MDA, GSH ve SOD sonuçları da değerlendirilmiş ve Tablo 3'de görülen sonuçlar elde edilmiştir. MDA düzeyi akut pankreatit modeli gerçekleştirilen kontrol grubu sıçanlarda $2,92$ nmol/mg bulunmuştur. Pinealektomi eklenen Grup II sıçanlarda MDA düzeyinde iki katına yakın bir artış olduğu ve $4,45$ nmol/mg düzeyine çıktığı görülmüştür. MDA değerleri açısından Grup I ve Grup II arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. (t:5,3, p=0,00).

Melatonin verilmesi ile birlikte Tablo 3'de görüldüğü gibi Grup III'deki sıçanlarda MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşüş saptanmıştır. (t:7,08, p=0,00). GSH düzeyleri Grup I'deki kontrol grubu sıçanlarda $2,2$ nmol/mg iken pinealektomi yapılan II. gruptaki düşük melatonin seviyesi sıçanlarda $1,72$ nmol/mg düzeyine indiği saptanmıştır. Ekzojen melatonin verilmesi GSH düzeylerini yükseltmiş ve Tablo 3'de görüldüğü gibi kontrol grubuna göre daha yüksek bir değere çıkartarak ortalama $2,87 \pm 0,19$ nmol/mg olmasını sağlamıştır (t:6,70, p=0,00).

SOD değerleri yönünden incelendiğinde kontrol grubu sıçanlarda ortalama $26,6$ U/mg olarak saptanan SOD düzeyi ile

Grup II ve Grup II'deki sıçanlarda saptanan $23,9$ U/mg ve $29,9$ U/mg değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur. Grup I ve Grup II için saptanan (t:3,6, p=0,003), Grup I ve Grup III için saptanan (t:2,3, p=0,029) dur.

Pinealektomi yapılan II. gruptaki (melatoninden yoksunlaştırılmış grup) sıçanlarda SOD düzeyinin kontrol grubuna (Grup I) ve melatonin tedavisi uygulanan gruba (Grup III) göre en düşük seviyede olduğu saptanmıştır (t:7,45, p=0,00).

Melatonin tedavisi uygulanan akut pankreatitli deneklerde mikroskopik olarak dokudaki ödemin ve hücre infiltrasyonunun belirgin olarak azaldığı, hemorajik alanların minimal olduğu ve asiner hücre dejenerasyonunun ise hiç olmadığı tespit edilmiştir. Bu gruptaki deneklerde asiner hücrelerdeki apoptotik cisimciklerde diğer gruplara göre oldukça azalmış olarak gözlemlendi. Deney gruplarının hiçbirinde asiner hücrelerde mitoz saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ortak safra yolu ve pankreatik kanalın ligasyonu sonrası ilk 24 saatte morfolojik değişikliklerin meydana geldiği saptanmıştır. Lerch ve arkadaşları, pankreatik kanal ligasyonu sonrası 3 saat içerisinde asiner hücre nekrozu, 12 saat içerisinde yağ nekrozu, hemoraji ve inflamasyonun geliştiğini göstermişlerdir (24). Çalışmamızda uygulanan obstruktif pankreatit modeli ile tüm gruplarda PMNL infiltrasyonu, hemoraji ve ödem belirgin olarak gözlemlenmiş ve akut pankreatitin histopatolojik bulguları gösterilmiştir.

Akut pankreatitte ortaya çıkan değişiklikler; tripsinojen aktivasyonu, pankreas enzimlerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin plazmada yükselmesi, parankimal nekroz gelişimi, organ disfonksiyonları gibi belirtilerin ortaya çıkış zamanı incelendiğinde, sıçanlarda bu sürenin 6 saat olduğu, insanlarda ise aynı patolojik değişikliklerin ancak 24-48 saat içinde meydana gelebildiği belirlenmiştir (8). Bizim çalışmamızda, cerrahi ligasyon ile pankreatit oluşturulduktan sonra tedavide melatonin etkinliğinin araştırılması için intraperitoneal melatonin uygulanmasına çalışmanın ilk 24. saati içinde başlanmıştır.

Melatonin, serbest radikal tutucu ve yüksek antioksidan etkili bir hormondur. Melatonin bu özellikleri nedeniyle hücreleri oksidatif hasardan koruyan, inflamasyonu azaltan ve doku ödemi gerileyen bir etkiye sahiptir (7). Bizim çalışmamızda, obstruktif akut pankreatit modeli oluşturulan sıçanlarda, bir hafta süreli melatonin tedavisinin PMNL infiltrasyonu, ödem, hemoraji ve inflamatuvar değişikliklerde önemli oranda azalma sağladığı gösterilmiştir. Pankreatit ve pinealektomi uygulanan melatoninden yoksunlaştırılmış II. Grup sıçanların pankreas dokusunun sadece pankreatit oluşturulan I. Gruba (kontrol grubu) benzediği, dokuda PMNL infiltrasyonu, ödem, hemoraji ve asiner hücrelerde dejenerasyon olduğu; intraperitoneal melatonin tedavisi uygulanan III. grupta, dokudaki ödem ve PMNL infiltrasyonunun belirgin olarak azaldığı, hemorajik alanların ve asiner hücre dejenerasyonunun hiç görülmediği, böylece melatoninin bu histopatolojik değişiklikleri engellediği veya şiddetini azalttığı tespit edilmiştir. Akut pankreatitli birinci grup deneklerdeki histolojik bulgular üçüncü gruptaki

deneklerde anlamlı ölçüde azaldığı halde ikinci gruptaki deneklerde önemli bir değişiklik saptanmamıştır. Birinci ve ikinci gruptaki deneklerde histolojik skorlama yönünden önemli bir fark olmamasının her iki grupta da ekzojen melatonin verilmesinden kaynaklandığı, akut pankreatitte ortaya çıkan histopatolojik bulguların pinealektomiden daha çok melatonin verilmesiyle değiştirilebildiği yorumu yapılmıştır.

Akut pankreatitte görülen apoptoz ve hücre nekrozu morfolojik olarak farklılık gösteren hücre ölümünün iki değişik formunu oluşturur. Apoptoz, hücrenin büzülüp nükleer membranın parçalanarak genomik DNA'nın hasarlanması sonucunda çekirdek kromatini dağılmasıyla oluşur ve apoptotik cisimcikler görülür (30). Pankreas, parotis ve böbrek gibi bazı parankim organlarda kanaliküler yapıların obstrüksiyonu sonucu gelişen atrofilerde histopatolojik olarak yaygın apoptoz gözlenir (9). Normal fizyolojik bir olay olan apoptoz terimi ile programlanmış hücre ölümü kastedilmekle birlikte artmış sitokinlerin (özellikle TNF- α) apoptozu arttırdığı kabul edilmektedir (5). Apoptoz değerlendirmesinin HE boyaması ile değil immünohistokimyasal yöntemlerle ve apoptoza özgü boyama ile yapılması gerektiği bilinmekle birlikte bu çalışmada da ekzojen melatonin uygulamasının apoptozu azalttığı gözlenmiştir.

Fujimoto ve arkadaşları pankreasta iskemi reperfüzyon hasarı sonrasında asiner hücrelerde artmış apoptotik aktiviteyi deneysel olarak göstermişlerdir (15). Bu çalışmada benzer bulgular saptanmakla birlikte melatonin tedavisi ile apoptoza giden asiner hücre sayısında sayısında görülmüş belirgin azalma olduğu ve bu bulgu melatoninin apoptozu önlediği, hücrelerin yaşam süresini uzattığı şeklinde yorumlanmıştır. Melatoninin apoptozu hangi mekanizma ile azalttığı ve bu azalmanın akut pankreatit fizyopatolojisinde olumlu veya olumsuz etkisi konusunda yapılmış çalışmalar mevcuttur. Kaiser ve arkadaşları akut pankreatitte apoptozun esas olarak pankreas kanallarının obstrüksiyonu nedeniyle olduğunu ve bu fizyopatolojik olayın pankreasta atrofiye yol açtığını belirtmektedirler (21). Akut pankreatitte asiner hücre apoptozunun aslında bir savunma mekanizması olduğu, pankreasta atrofi sonucu pankreatik enzim sekresyonlarının azalacağı, böylece pankreatitin önemli komponentlerinden biri olan enzimatik faaliyetlerin şiddetini kaybedeceğini iddia eden yazarlar vardır (21,30).

Jaworek ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, melatoninin lipid peroksidasyonu ve pankreasta ödemi azalttığı, IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α ve Amilaz konsantrasyonlarını baskıladığı gösterilmiştir (17). Yine iskemi reperfüzyonla yapılan başka bir çalışmada, iskemik hasar öncesi ve sonrası olmak üzere önleyici ve tedavi edici melatonin uygulaması yapılmasının oksidatif stres ve pankreas doku hasarı üzerinde sitoprotektif etkisinin olduğu saptanarak melatoninin hücre fonksiyonlarını düzelttiği belirtilmiştir (26).

Ekzojen melatonin verilmesiyle organizmada tüm dokularda yüksek melatonin düzeyi sağlanmış olmaktadır. Canlı organizmada normalde melatonin düzeyleri bazı organ ve dokularda birbirinden farklıdır. Melatonin pineal bez dışında bağırsaklardan da salgılanmakla birlikte asıl melatonin kaynağının pineal bez olduğu bilinmektedir. Konturek ve arkadaşlarının 125I-Melatonin ile yaptıkları immunoreaktif çalışmalarda

(22,23), sıçanlarda doku homojenatlarında melatonin konsantrasyonlarının barsaklarda pineal beze oranla oldukça düşük düzeyde olduğu saptanmıştır. Melatonin salınımının barsaklarda pineal beze göre 20 kat daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Barsaklardaki melatonin doku düzeyleri melatonin prekürsörlerinin oral alımından direkt olarak etkilendiği halde pineal bezdeki yüksek melatonin düzeyleri bu maddelerin alımından dolayı olarak ve düşük oranda etkilenmektedir. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda çöliak arterden verilen radyoaktif 125I-Melatonin alımını takiben 15.sn'de karaciğer, mide, ince barsak (duodenum, jejunum, ileum) ve kolon mukozasında; 30. sn'de karaciğer ve safrada yüksek oranda melatonin saptanmıştır. Bu konuda yapılmış bütün çalışmalarda ekzojen yoldan verilen melatoninin safradaki konsantrasyonunun, periferik kandan ve hatta portal venden daha yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir (22,23). Bu durum melatoninin safra ile sekresyonunun önemli olduğunu, intraperitoneal yoldan verilen melatoninin bariyerleri kolay geçme özelliği nedeniyle hızlı bir şekilde absorbe olarak enterohepatik dolaşıma geçebildiği, melatoninin karaciğer ve safrada konsantrasyonunun özellikle yüksek olması nedeniyle etkisinin hepatobiliyer sistemde daha somut gözleneceği şeklinde yorumlanmıştır.

Melatonin, gastrointestinal kanal mukozasında, hepatopankreatik metabolizmada kısa sürede indole metabolize olmaktadır. Bu nedenle intravenöz olarak verilen melatonin kısa sürede metabolize edilmekte ve etkisini uzun süre devam ettirememektedir. Deri altına veya intraperitoneal uygulamalarda ise daha uzun süreli yüksek konsantrasyonlar elde etmek mümkün olmaktadır. Pineal bezi alınan sıçanlarda sistemik dolaşımda plazma melatonin konsantrasyonu çok düşük olduğu halde, portal vende ve karaciğerde daha yüksek melatonin seviyesine rastlanmaktadır (22,23). Bu bulgu pineal bez dışında enteral melatonin yapıldığının en somut göstergesi olarak kabul edilmektedir. Oral olarak alınan triptofanın melatonin prekürsörü olarak özellikle akut gastrik lezyonlarda etkinliği gösterilmiş olup bu madde hızla melatoninine dönüşerek lipid peroksidasyonunu azaltmakta, antioksidatif ezimleri aktive ederek serbest radikalleri tutucu etkisiyle yüksek gastroprotektif etki göstermekte ve oksidatif strese bağlı gastrik lezyonları engellemektedir (6,18,23). Ekzojen melatonin ve L-triptofan'dan üretilen endojen melatonin, akut pankreatitte oksidatif stresten organı koruyup doku hasarını azaltarak pankreatikoprotektif etki göstermektedir (19).

Antioksidanlar yüksek dozda kullanıldığında organizmada oldukça ciddi yan etkilere ve toksisiteye neden olabilmektedir. Melatonin, diğer antioksidanların aksine çok yüksek dozlarda ve uzun süre kullanımında bile toksik bir etki göstermemektedir (23). III. grupta, 7 gün boyunca oldukça yüksek dozda melatonin enjeksiyonu uygulanmasına rağmen deneklerin hiçbirinde toksik etki gözlenmemiştir.

Deneysel akut pankreatit oluşturulan sıçanlarda AST ve ALT gibi enzimlerde belirgin artış olduğu ve AST'nin ortalama 618 U/L, ALT'nin ise 222 U/L düzeyine çıktığı gözlenmiştir. Tablo 1'de görüldüğü gibi işleme pinealektomi eklenmiş olması özellikle AST düzeylerindeki bu artışın daha düşük seviyede kalmasına neden olmuş, ekzojen melatonin verilmesiyle bu enzimdeki düşmenin daha da belirgin olduğu ve bu düşüşün

istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Ancak benzer düşme ALT değerlerinde olmayıp tam tersine ALT düzeylerinin ekzojen melatonin verilen gruplarda kontrol grubuna oranla arttığı tespit edilmiştir. Tablo 1’de görüldüğü gibi ALT düzeyleri kontrol grubunda ortalama 222 U/L iken pinealektomi grubunda önemli bir değişikliğe uğramadan bu düzeylerde kalmış (219 U/L), ekzojen melatonin verilmesiyle birlikte Grup III’deki sıçanlarda ise düşmediği gibi istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir. Hepatosit nekrozunun önemli göstergelerinden biri olan ve daha çok karaciğere spesifik doku hasarını gösteren AST ile karaciğer, böbrek, pankreas veya kas dokularındaki hücresel hasar, fibrozis olaylarında arttığı tespit edilen ALT için farklı sonuçlar elde edilmesi melatoninin veriliş yolunun subkütan, intravenöz veya intramuskuler değil, intraperitoneal olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Melatoninin sistemik olarak verilmeyip intraperitoneal yoldan uygulanmış olması nedeniyle etkisinin daha çok karaciğer üzerinde olduğu kabul edilmiştir. Bu veriliş yolu nedeniyle melatoninin parankimatöz organlarla kas dokusunda yeterli derecede etkili olamadığı için ALT düzeylerinde düşme sağlayamadığı şeklinde yorumlanmıştır.

LDH, doku iskemisine duyarlı bir enzimdir. Biliopankreatik kanal obstrüksiyonu sonucu sıçanlarda geçici iskemi ve reperfüzyon hasarından sonra meydana gelen pankreatik hasarın patogenezinde geçici pankreatik iskemi/reperfüzyonun ve serbest oksijen radikallerinin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. LDH düzeyinin akut pankreatitli olgularda pankreatitin şiddetine bağlı olarak arttığı saptanmıştır (27). LDH değerlerinin III. gruba oranla diğer gruplarda belirgin olarak yüksek saptanması, pankreasta iskemi ve nekroz üzerine melatoninin sitoprotektif veya tedavi edici etkisi olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Melatonin verilmesinin amilaz düzeyleri üzerindeki etkisi konusunda elde edilen sonuçlar oldukça farklılık göstermektedir. Bazı çalışmalarda sağlıklı organizmada ekzojen melatonin verilmesinin amilaz aktivitesinde belirgin artışa yol açtığı tespit edilmiştir (19,20). Bizim çalışmamızda pinealektomi uygulanan deneklerde serum amilaz düzeyinin çok yüksek değerlere ulaştığı, ekzojen melatonin verilen akut pankreatit modellerinde ise (Grup III) istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür. Bu durum endojen melatonin kaynağı olan pineal bezin devre dışı bırakılarak serum melatonin düzeyinin düşürülmesinin veya normalin altına indirilmesinin akut pankreatit şiddetini arttırdığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu verilere dayanarak; ekzojen melatonin verilmesinin normal organizmada amilaz düzeyini arttırıcı, akut pankreatite bağlı yükselmiş amilaz değerlerini azaltıcı bir etki yaptığını söylemek mümkündür.

Biliopankreatik kanalın ligasyonu yapılan sıçanlarda akut pankreatitin yanı sıra aynı zamanda obstrüktif ikter de gelişmektedir. Bizim çalışmamızda da, sakrifiye edilen deneklerin relaparotomilerin tümünde safra kanallarında belirgin dilatasyon olduğu izlenmiştir. Deneklerin bilirubin düzeyleri karşılaştırıldığında, tümünde özellikle konjuge bilirubin düzeylerinde önemli oranda artış saptanmıştır. Bu durum ana safra kanallarının (koledok) cerrahi ligasyon işleminin doğal bir sonucudur. I. ve II. gruplarda serum bilirubin değerleri en yüksek

düzelere ulaşarak ortalama 13-18 mg/dl olmuş, buna karşılık melatonin verilen III. grupta serum bilirubin değerinde göreceli bir düşme saptanmış, total bilirubin düzeylerinin ortalama 5,67 mg/dl düzeyine kadar indiği saptanmıştır. (Bkz Tablo 2) Bu bulgu ile karaciğer ve safraya yüksek oranda geçiş gösterebilen melatoninin intraperitoneal yoldan verilmesiyle tıkanma sarılıklarında meydana gelen hiperbilirubinemi, oksidatif hepatosit hasarı ve hepatobiliyer fonksiyon bozukluğunun kısmen önlenildiği ortaya konulmuştur.

Akut pankreatit’te lipid peroksidasyonunun artması ve pankreatit şiddeti ile oksidatif stres arasında bir korelasyon olduğu bilinmektedir (28). Weber ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, akut pankreatitte oksijen türevleri membran lipidlerinin belirgin peroksidasyonunu başlattığı gösterilmiştir. Bu etki sonucu MDA düzeyinde ilk 30 dakika sonunda anlamlı bir artış başladığı ve bu artışın 16 saat kadar sürdüğü gösterilmiştir (32). Çalışma grubumuzda MDA, GSH ve SOD değerleri birlikte incelendiğinde kontrol grubu akut pankreatitli sıçanlarda saptanan yüksek serum düzeylerinin 2. grupta istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşmesine rağmen aynı bulgu III. grup sıçanlarda MDA değerlerinde gözlemlendiği kadar belirgin değildir. Tablo 3’de görüldüğü gibi kontrol grubu akut pankreatitli deneklerde belli bir düzeye çıkan MDA değerlerinin işleme pinealektominin ilave edilmesiyle anlamlı ölçüde yükseldiği, buna karşılık GSH ve SOD düzeylerinin düştüğü saptanmıştır. Lipid peroksidasyonu geleneksel olarak MDA ölçümü ile değerlendirilmektedir. Güçlü bir antioksidan olan melatonin molekülü, kolaylıkla oksitlenmez ve hidroksil radikali üreten reaksiyonlara katılmaz (27). MDA, GSH ve SOD düzeyleri ile ilgili bu bulgular melatoninin etkisi ile ilgili yapılmış çalışmaların sonuçları ile uyumludur (10). Grup II’de MDA düzeyinin yükselmesi, pinealektomi yapılarak organizmada ikinci bir lipid peroksidasyon hasarı meydana getirildiği ve MDA düzeyinin buna bağlı olarak yükseldiği şeklinde yorumlanmıştır. I.ve III grup sıçanlar arasındaki MDA düzeyi farkının istatistiksel olarak anlamlı bulunması melatoninin MDA düzeyini düşürücü etkisini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak bu çalışmada; ekzojen melatonin verilmesinin, akut pankreatitli deneklerde hastalığın fizyopatolojisinde önemli rol oynayan antioksidan enzimlerin üzerine etki etmemekle birlikte lipid peroksidasyon ürünlerinden MDA düzeylerinde belirgin bir düşmeye yol açtığı, hastalığın biyokimyasal parametrelerinden AST, amilaz, LDH ve bilirubin düzeylerini önemli oranda azalttığı, dokudaki hasarın en önemli histopatolojik bulguları olan PMNL infiltrasyonu, ödem, hemoraji, asiner hücre nekrozu ve apoptozda büyük ölçüde azalma sağladığı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Alhan E, Kalyoncu NI, Kural BV, Erçin C. Effects of melatonin on acute necrotizing pancreatitis in rats. *Z Gastroenterol.* 2004; 42:967-972.
2. Banks PA, Freeman ML: Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 2006; 101:2379-2400.
3. Beger HG, Rau BM. Severe acute pancreatitis: Clinical course and management. *World J Gastroenterol.* 2007; 13:5043-5051.

4. Beutler E. Red Blood cell metabolism: A manual of biochemical methods. In Beutler E, Ed. 2 nd Ed. New York: Grune&Stratton Inc, 1984; pp74-76.
5. Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 286:G189-196
6. Brzozowski T, Zwirska-Korczala K, Konturek PC, Konturek SJ, Sliwowski Z, Pawlik M, Kwiecien S, Drozdowicz D, Mazurkiewicz-Janik M, Bielanski W, Pawlik WW. Role of circadian rhythm and endogenous melatonin in pathogenesis of acute gastric bleeding erosions induced by stress. *J Physiol Pharmacol.* 2007; 6:53-64.
7. Bülbüller N, Dođru O, Umaç H, Gürsu F, Akpolat N. The effects of melatonin and pentoxifylline on L-arginine induced acute pancreatitis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2005; 11:108-114.
8. Cantürk NZ, Sayek İ. Cerrahi Araştırma. Ankara 2005:389-401.
9. Dabrowski A, Konturek SJ, Konturek JW, Gabryelewicz A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol.* 1999; 377:1-11.
10. Chen HM, Chen JC, Ng CJ, Chiu DF, Chen MF. Melatonin reduces pancreatic prostaglandins production and protects against caerulein-induced pancreatitis in rats. *J Pineal Res.* 2006; 40:34-39.
11. Demircan O, Sönmez H, Ersöz C, Atay A. Koledok ve pankreatik kanal ligasyonuylu akut pankreatit. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 1997; 3:175-180
12. Estebauer H, Cheeseen KH. In Packer C, Glazer AN. Oxygen radicals in biological systems, methods in enzymology. California: Academic Pres 1990: 407-421.
13. Eşrefoğlu M, Gül M, Ateş B, Batçiođlu K, Selimođlu MA. Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:259-264.
14. Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. *Lancet.* 2008; 371:143-152.
15. Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, Lee J, Koshiba T, Miyamoto Y, Doi R, Imamura M. Ischemia-reperfusion injury on the pancreas in rats: identification of acinar cell apoptosis. *J Surg Res.* 1997; 71:127-136.
16. Hoffman RA & Reiter RJ. Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. *Anatomical Record.* 1965; 24:83-89.
17. Jaworek J, Konturek SJ, Tomaszewska R, Leja-Szpak A, Bonior J, Nawrot K, Palonek M, Stachura J, Pawlik WW. The circadian rhythm of melatonin modulates the severity of caerulein-induced pancreatitis in the rat. *J Pineal Res.* 2004; 37:161-170.
18. Jaworek J, Brzozowski T, Konturek SJ. Melatonin as an organoprotector in the stomach and the pancreas. *J Pineal Res.* 2005; 38:73-83.
19. Jaworek J, Nawrot-Porabka K, Leja-Szpak A, Bonior J, Szklarczyk J, Kot M, Konturek SJ, Pawlik WW. Melatonin as modulator of pancreatic enzyme secretion and pancreatoprotector. *J Physiol Pharmacol.* 2007; 6:65-80.
20. Jaworek J, Nawrot K, Konturek SJ, Leja-Szpak A, Thor P, Pawlik WW. Melatonin and its precursor, L-tryptophan: influence on pancreatic amylase secretion in vivo and in vitro. *J Pineal Res.* 2004; 36:155-164.
21. Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol.* 1995; 269:1295-1304.
22. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Bubenik GA. Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol.* 2007; 6:23-52
23. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, Pawlik M, Sliwowski Z, Cze_nikiewicz-Guzik M, Kwiecie_ S, Brzozowski T, Bubenik GA, Pawlik WW. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol.* 2007; 58:381-405.
24. Lerch MM, Saluja AK, Dawra R, Ramaraò P, Saluja M, Steer ML. Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells. *Gastroenterology.* 1992; 103:205-213.
25. Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
26. Muñoz-Casares FC, Padillo FJ, Briceño J, Collado JA, Muñoz-Castañeda JR, Ortega R, Cruz A, Túnez I, Montilla P, Pera C, Muntané J. Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *J Pineal Res.* 2006; 40:195-203.
27. Palaođlu OS, Beřkonaklı E. Pineal gland and aging. *Turkish Journal of Geriatrics.* 1998; 1:13-18.
28. Park BK, Chung JB, Lee JH, Suh JH, Park SW, Song SY, Kim H, Kim KH, Kang JK. Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2003; 9:2266-2269.
29. Sun E, XU Hi Liu Q et al. The mechanism for the effect of selenium supplementation on immunity. *Biol Trace Elem Res* 1995; 48:231-238.
30. Walker NI. Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. *Am J Pathol.* 1987; 126:439-451.
31. Warzecha Z, Dembinski A, Ceranowicz P, Dembi_ski M, Kownacki P, Konturek SJ, Tomaszewska R, Stachura J, H_adki W, Pawlik WW. Immunohistochemical expression of FGF-2, PDGF_A, VEGF and TGF-_ RII in the pancreas in the course of ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis. *J. Physiol Pharmacol* 2004; 55:791-810.
32. Weber H, Merkord J, Jonas L, Wagner A, Schröder H, Käding U, Werner A, Dummmler W. Oxygen radical generation and acute pancreatitis: effects of dibutyltin dichloride/ethanol and ethanol on rat pancreas. *Pancreas.* 1995; 11:382-388.