

Alt ekstremitte iskemi reperfüzyonunun yol açtığı akciğer hasarında melatoninin koruyucu etkinliği

Protective effect of melatonin on lung injury caused by ischemia-reperfusion of the lower extremities

Ayhan Uysal,¹ Oktay Burma,¹ İlker Akar,¹ Kadir Kaan Özsin,¹ Ali Rahman,¹ Bilal Üstündağ,² Hanifi İbrahim Özercan³

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, ²Biyokimya Anabilim Dalı, ³Patoloji Anabilim Dalı, Elazığ

Amaç: Alt ekstremitte iskemi sonrası reperfüzyon döneminde nötrofil infiltrasyonuna ve serbest oksijen radikallerine bağlı olarak akciğer hasarı oluşmaktadır. Başlıca pineal bezden salgılanan melatonin, çeşitli fizyolojik ve nöroendokrin fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynar. Bu çalışmada, deneysel alt ekstremitte iskemi-reperfüzyonuna (İ-R) bağlı oluşan akciğer hasarı ve bunları önlemede melatoninin koruyucu etkisi araştırıldı.

Çalışma planı: Çalışmada, 40 adet Yeni Zelanda cinsi beyaz erkek tavşan kullanıldı. Tavşanlar rasgele dört gruba ayrıldı: Grup 1 (sham grubu, n=10), grup 2 (I-R grubu, n=10), grup 3 (preiskemik tedavi grubu, n=10) ve grup 4 (prereperfüzyon tedavi grubu, n=10). Grup 1'de sadece anestezi uygulandı ve 6 saat bekleme sonrası kan ve doku örnekleri alındı. Grup 2, 3 ve 4'de anestezi verildikten sonra iki taraflı arka ekstremitte, kalça eklemi hizasından turnike ile sıkıldı. Dört saat iskemi sağlandıktan sonra turnike açıldı ve iki saat reperfüzyon sonrası kan-doku örnekleri alındı. Melatonin, grup 3'te iskemiden ve grup 4'te reperfüzyondan 15 dakika önce 10 mg/kg intraperitoneal yolla verildi. Alınan kan örneklerinde plazma malondialdehit (MDA), akciğer dokusunda ise doku MDA düzeyleri saptandı. Ayrıca akciğerler histopatolojik olarak incelendi.

Bulgular: Doku ve plazma MDA seviyeleri grup 4'te grup 2 ve grup 3'e göre anlamlı derecede daha düşük bulundu ($p<0.01$). Histopatolojik incelemede reperfüzyondan hemen önce melatonin verilen grupta (grup 4) nötrofil sayısı ile interstisyel ödem ve konjesyonun daha az, alveoller arası septumların daha ince olduğu saptandı ($p<0.01$).

Sonuç: Reperfüzyondan önce melatonin kullanımı, alt ekstremitte geçici iskemi-reperfüzyonuna bağlı akciğerlerde oluşan hasarı azaltmaktadır. Bunu da lipid peroksidasyonunu önleyerek ve nötrofil infiltrasyonunu azaltarak gerçekleştirmektedir.

Anahtar sözcükler: Akciğer/patoloji; melatonin/tedavide kullanım; reperfüzyon hasarı.

Background: Lung injury occurs following lower limb reperfusion due to neutrophil infiltration and free oxygen radicals. Melatonin, the chief secretory product of the pineal gland, plays a role in the regulation of various physiological and neuroendocrine functions. In this study, injury in the lungs due to experimental lower extremity ischemia-reperfusion (I-R) and the protective effect of melatonin were investigated.

Methods: Forty male New Zealand white rabbits were used in the study. Rabbits were randomly divided into four groups: Group 1 (sham group, n=10), group 2 (I-R group without treatment, n=10), group 3 (preischemia treatment group, n=10), group 4 (prereperfusion treatment group, n=10). Only anesthesia was performed to rabbits in group 1 and after 6 hours blood and tissue samples were taken. In groups 2, 3 and 4, after anesthesia tourniquets were applied to bilateral hind limbs at the hip level. After 4 hours of ischemia, the tourniquets were removed and following two hours of reperfusion period, blood and tissue samples were taken. Melatonin (10 mg/kg) was administered intraperitoneally 15 minutes before ischemia to group 3, and 15 minutes before reperfusion to group 4. Plasma malondialdehyde (MDA) levels were measured in blood samples and lung tissue MDA levels were determined. Additionally, lung tissue was examined histopathologically.

Results: The levels of tissue and plasma MDA were found to be significantly lower in group 4 when compared to groups 2 and 3 ($p<0.01$). Histopathological examination revealed a lower neutrophil count, less interstitial edema and congestion in group 4 ($p<0.01$), in which the septums between the alveoli were also thinner.

Conclusion: Administration of melatonin before reperfusion decreased the lung injury caused by temporary lower extremity ischemia-reperfusion. Melatonin exerts these effects by inhibiting lipid peroxidation and neutrophil infiltration.

Key words: Lung/pathology; melatonin/therapeutic use; reperfusion injury.

Alt ekstremitte iskemi-reperfüzyonu sık karşılaşılan ve klinik açıdan önemli sonuçları olan bir olaydır. İskemi sonrası reperfüzyonla birlikte serbest oksijen radikalleri (SOR) ve inflamatuvar mediatörlerin etkisiyle hem lokal hem de sistemik hasar oluşumu başlamış olur.^[1] Kan akımının yeniden sağlanması ekstremitteyi kurtarmasına karşın, multisistem organ disfonksiyonu gelişimine ve mortaliteye neden olabilmektedir. Bu hasar özellikle miyokard dokusunda, böbreklerde ve akciğerlerde gözlenebilir.^[2] Akciğer dokusu alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarından en çok etkilenen hedef organ olup oluşan hasar sonucu bazı olgularda uzamış ventilatör ve inotropik destek gereksinimine, dolayısıyla da mortaliteye neden olabilmektedir.^[3] Bu hasarın önlenmesi veya azaltılmasına yönelik pek çok ilaç ve yöntem denenmiştir.

Melatonin bir indolamin türevi olup sirkadiyen ritimle salınım gösteren pineal bez hormonudur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda melatoninin kardiyoprotektif, nöroprotektif, antiinflamatuvar, antikanserijen, analjezik özellikleri olduğu ve vücut ısısı, kan basıncı, gonadal fonksiyonlar ile uyku uyandırma siklusunu düzenlemede etkinliğinin bulunduğu gösterilmiştir.^[4-6] Bu etkilerin bazılarının melatoninin hem doğrudan serbest oksijen radikali (SOR) temizleyici hem de dolaylı olarak antioksidan enzim aktivitelerini artırıcı özelliğinden kaynaklandığı bilinmektedir.^[7]

Bu çalışmada, deneysel alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon modelinde gelişen akciğer hasarını önlemede farmakolojik olarak uygulanan melatoninin etkinliği araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada ağırlıkları 2400-2800 gram arasında gelişen 40 adet Yeni Zelanda cinsi sağlıklı beyaz erkek tavşan kullanıldı.

Denekler rasgele dört gruba ayrıldı;

Grup 1 (G1, sham grubu, n=10); sadece anestezi uygulanıp altı saat beklemeden sonra kan ve doku örnekleri alınan grup.

Grup 2 (G2, iskemi/reperfüzyon=kontrol grubu, n=10); dört saat iskemiye takiben iki saat reperfüzyon uygulandıktan sonra kan-doku örnekleri alınan grup.

Grup 3 (G3, preiskemik tedavi grubu, n=10); iskemiden 15 dakika önce 10 mg/kg melatonin uygulanıp, dört saat iskemi ve iki saat reperfüzyon sonrası kan-doku örnekleri alınan grup.

Grup 4 (G4, prereperfüzyon tedavi grubu, n=10); dört saat iskemi bitiminde reperfüzyonun başlamasından 15 dakika önce 10 mg/kg melatonin uygulanıp iki saatlik reperfüzyon sonunda kan-doku örnekleri alınan grup.

Anestezi tekniği. Anestezi, 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar flk, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 2 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun flk, Bayer, Türkiye) intramüskuler yolla uygulanarak sağlandı. Tavşanlar gerektiğinde ilk dozun 1/3'ü ilave dozlar ile işlem boyunca solunumları spontan devam edecek şekilde uyutuldu.

Cerrahi teknik ve örneklerin alınması. Tavşanların deneyden sekiz saat önce sadece su içmelerine izin verilip yemleri kesildi. Sham grubu dışındaki tüm deneklerde her iki bacak iki dakika süreyle elevasyonda tutulup bacakta kalan kan miktarı minimale indirildi. Hardy ve ark.nın^[8] tarif ettiği, akut iskemi-reperfüzyon modeline uygun olarak kollateral ve femoral arter akımlarını durdurmak amacıyla, her iki alt ekstremitte torakanter majörün proksimal kısmından geçecek şekilde turnike uygulanarak iki taraflı alt ekstremitte iskemisi oluşturuldu. Denekler sırtüstü pozisyona getirildi. Arteriyal akımın durdurulduğu portatif doppler cihazı (Promelec, Microdop, Norm. IEC 601.1, France) ile tespit edildi. Dört saatlik iskemi süresi tamamlandıktan sonra turnike açılarak reperfüzyon başlatıldı, reperfüzyonun 10. dakikasında yine portabl doppler cihazı ile kan akımının başlamış olduğu teyit edildi. Grup 2'deki deneklere herhangi bir tedavi verilmedi. Grup 3'te iskemi oluşturulmadan 15 dakika önce, Grup 4'te iskemi devam ederken turnike açılmasından 15 dakika önce 10 mg/kg N-asetil 5-Metoksitriptamin (Melatonin, 1 gr flk, Sigma Chemical Co, USA) intraperitoneal olarak uygulandı. İki saatlik reperfüzyon süresi sonunda göğüs tüyleri tıraş edilerek ameliyat sahası %10 povidin iyodun (Pol-yod, Drogan, Türkiye) ile temizlendi. Yalnızca insizyon sahası açık kalacak şekilde steril olarak örtüldü ve steril aletler kullanılarak median sternotomi uygulandı.

Sternum açıldıktan sonra perikard insizyonu uygulandı. Kalbe yapılan direkt ponksiyonla 3 ml kan alınarak EDTA'lı (Etilendiamintetraasetik asit) tüplere koyuldu. Ardından tüm denekler intrakardiyak %10'luk formol ile sakrifiye edildi.

Trakea kesilerek akciğerler ve kalp blok halde çıkarıldı. Kalp apekten kesildi ve sağ atriumdan sokulan kateterden verilen deiyonize su ile pulmoner arteriyel yatak, venöz dönüş berrak oluncaya kadar yıkandı. Doku malondialdehit (MDA) analizinde kullanılacak olan sağ akciğer, 10 ml serum fizyolojik solüsyonu içerisinde yıkandıktan sonra alüminyum folyo ile sarılarak çalışma yapılıncaya kadar -70 °C de saklandı.

Histopatolojik inceleme yapılacak olan sol akciğer ise yıkama işlemine tabi tutulmadan %10'luk formaldehit solüsyonu içine koyuldu ve patoloji laboratuvarına gönderildi.

Etilendiamintetraasetik asit'li tüpe alınan kan örnekleri 3000 devirde santrifüje edildi. Üstte ayrılan

plazma alınarak plazma MDA çalışması için -20°C 'de saklandı.

Örneklerin biyokimyasal olarak incelenmesi

Plazma malondialdehit tayini. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, 95°C 'de MDA'nın tiyobarbitürik asit ile reaksiyonu sonucu pH: 3.4 olan bir ortamda inkübasyonu ile oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm 'de spektrofotometrik (Schimadzu UV-1201, Japan) ölçülmesiyle saptandı. Ölçülen plazma MDA değeri nmol/ml olarak ifade edildi.^[9,10]

Doku MDA düzeyi ölçümü. Doku MDA miktarı, Wasowicz ve ark.nın^[11] tarif ettiği yöntemle göre yaş gram doku başına normal olarak hesaplandı.

Histopatolojik değerlendirme. Tüm grupların alınan sol akciğer örnekleri %10'luk formol içinde tespit edilerek rutin takip işlemlerinden geçirildi. Parafin bloklara gömülen dokulardan $4\ \mu\text{m}$ kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitler deparafinize edilerek Hemotoksilen-Eozin (H-E) ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. Büyütme alanı içerisinde bulunan akciğer dokusundaki nötrofil (PNL) yoğunluğu, konjesyon ve interstisyel ödem semikantitatif olarak değerlendirildi. Daha önce Tossiopoulos ve ark.nın^[12] kul-

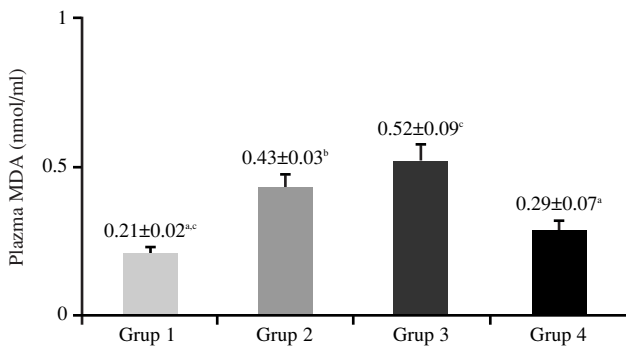
landıkları skorlama sistemi modifiye edilerek akciğerlerde oluşan hasarın miktarı saptandı. Buna göre 0 puan değişiklik yok; 1 puan fokal, hafif değişiklikler; 2 puan multifokal orta dereceli değişiklikler; 3 puan multifokal belirgin değişiklikler; 4 puan yaygın belirgin değişiklikler olarak değerlendirildi. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak ifade edildi.

İstatistiksel değerlendirme. İstatistiksel değerlendirmeler bilgisayarda SPSS 10.0 (Statistical Programme Software System) programı kullanılarak yapıldı. Grup içi değerlendirmede Mann Whitney U-testi, gruplar arası karşılaştırmada ise tek yönlü varyans analizi Kruskal-Wallis testleri kullanıldı. $P<0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi. Elde edilen veriler ortalama \pm SD olarak gösterildi.

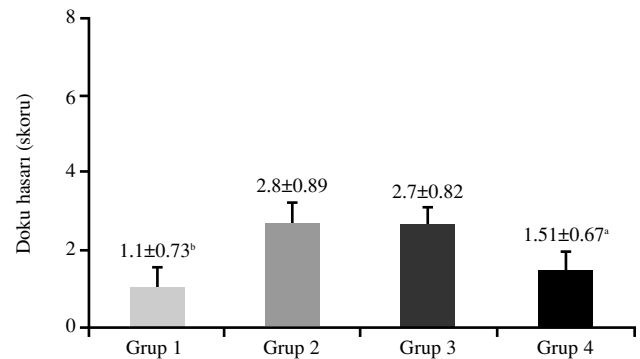
BULGULAR

Şekil 1'de plazma MDA düzeylerinin tüm gruplar arasındaki karşılaştırmaları gösterildi. Grup 2 ile grup 4 karşılaştırıldığında aralarında anlamlı derecede fark saptandı ($p<0.01$). Grup 2 ile grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

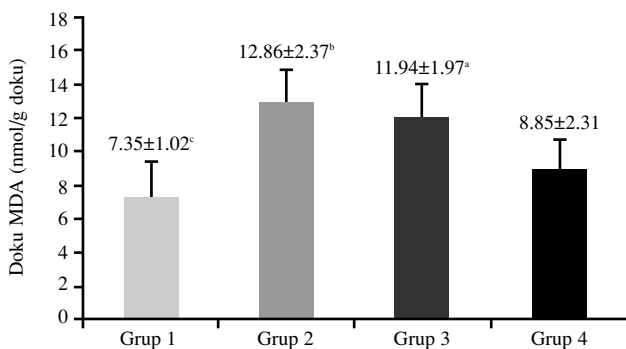
Şekil 2'de akciğer doku MDA düzeylerinin tüm gruplar arasındaki karşılaştırmaları gösterildi.



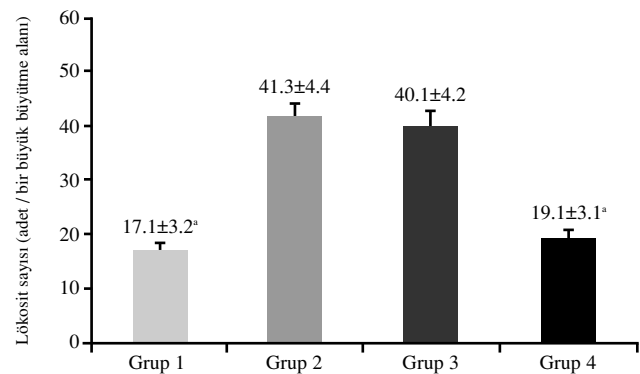
Şekil 1. Plazma MDA düzeyleri (^a $p<0.05$ grup 1 ile grup 4; ^b $p<0.01$ grup 2 ile grup 4; ^c $p<0.001$ grup 1 ile grup 2 ve 3; grup 3 ile grup 4).



Şekil 3. Doku hasarı değerleri (^a $p<0.01$ grup 4 ile grup 2 ve 3; ^b $p<0.001$ grup 1 ile grup 2 ve 3).

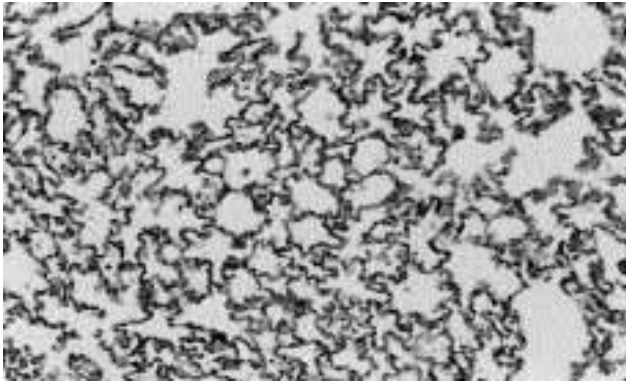


Şekil 2. Akciğer dokusu MDA düzeyleri (^a $p<0.05$ grup 3 ile grup 4; ^b $p<0.01$ grup 2 ile grup 4; ^c $p<0.001$ grup 1 ile grup 2 ve 3).

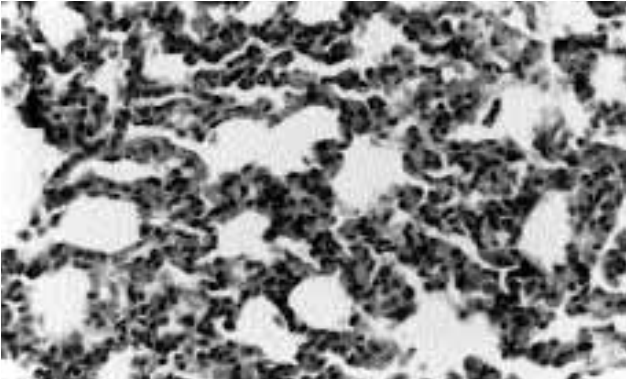


Şekil 4. Akciğer lökosit değerleri (^a $p<0.001$ grup 1 ile grup 2 ve 3; grup 4 ile grup 2 ve 3).

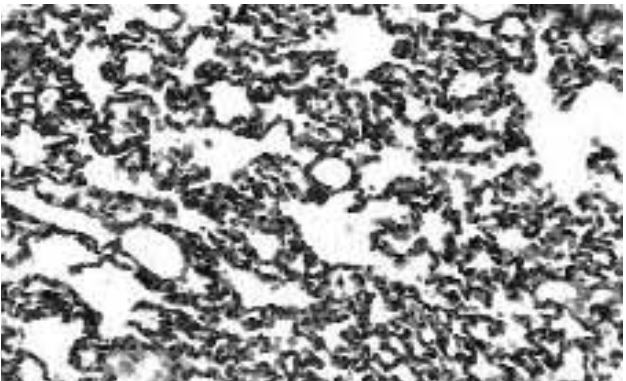
Doku MDA düzeylerinin sham grubuna göre diğer bütün gruplarda artmış olduğu görüldü. Sham grubu ile karşılaştırıldığında grup 2 ve grup 3'teki artış istatistiksel olarak anlamlı iken ($p < 0.001$), grup 4'teki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p > 0.05$). İskemi-reperfüzyon uygulanan gruplardan grup 4 ile grup 2 ve grup 3 karşılaştırıldığında grup 4'teki doku MDA değerlerindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı derecede az olduğu saptandı (grup 2 için $p < 0.01$ ve grup 3 için $p < 0.05$). Grup 2 ve grup 3 arasında ise istatistiksel fark saptanmadı ($p > 0.05$).



Şekil 5. Grup 1 (sham) deneklere ait akciğer dokusu (H-E x 100).



Şekil 6. Grup 2 (iskemi / reperfüzyon = kontrol grubu) deneklere ait akciğer dokusu (H-E x 100).



Şekil 7. Grup 4 (prereperfüzyon tedavi grubu) deneklere ait akciğer dokusu (H-E x 100).

Tüm grupların hasar skor puan değerleri ile lökosit sayıları ve dağılımları Şekil 3 ve 4'te görülmektedir.

Sham grubunda yapılan histopatolojik değerlendirilmede normale yakın bir akciğer dokusu görüldü (Şekil 5). Sham grubunda daha az PNL birikimi ile alveoller septumların ince olduğu görülürken, interstisyel ödem ve konjesyon gözlenmedi. İskemi-reperfüzyon grubunda (grup 2) alveoller arası septumda belirgin kalınlaşma, PNL sayısında artma, yaygın interstisyel ödem ve konjesyon saptandı (Şekil 6). Reperfüzyondan hemen önce melatonin verilen grupta (grup 4) ise PNL sayısının, interstisyel ödemin ve konjesyonun daha az ve alveoller arası septumların daha ince olduğu görüldü (Şekil 7).

Akciğerlerdeki patolojik değişikliklerin derecesini ifade edebilmek için kullanılan semikantitatif değerlendirmede hesaplanan hasar skor puanında en düşük değer sham grubunda (grup 1) olduğu görüldü. Bu grubun hasar skor puanı 1.1 olarak bulundu. İskemi-reperfüzyon grubunda (grup 2) hasar skor puanı 2.8, grup 3'de ise 2.7 olarak hesaplandı. Sham grubu ile grup 2 ve grup 3 hasar skor puanları yönünden karşılaştırıldıklarında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.001$). Reperfüzyondan önce melatonin verilen grupta (grup 4) hasar skor puanı 1.51 olarak bulundu. Grup 4 ile grup 2 ve grup 3 karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p < 0.01$).

TARTIŞMA

Ekstremitte iskemisi periferik vasküler cerrahi, aort cerrahisi, ekstremitelerin reimplantasyonu, crush injuri, periferik vasküler yaralanmalar ya da akut arteriyel tıkanıklıklar sırasında karşılaşılan bir durumdur.

Akut ekstremitte iskemisi kollaterallerin gelişmiş olduğu kronik ateroskleroz varlığında bile ciddi mortalite ve morbiditeye yol açabilen klinik bir sorundur. Ekstremitte reperfüzyonu tam olarak sağlansa bile ekstremitte kaybına, akut böbrek ve solunum yetmezliğine yol açabilir. Kalp, bağırsak, beyin, dalak gibi dokularda fonksiyon bozukluğu gelişebilir.^[13,14] Cerrahi müdahalenin gecikmesi bu riskleri daha da artırır.

Alt ekstremitelerde oluşan geçici iskemide reperfüzyon hasarı sonucunda diğer hedef organlarda olduğu gibi akciğerlerde de önemli ölçüde patolojik değişikliklerin olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.^[15-17] Bu durum bazı olgularda uzamış ventilatör ve inotropik destek gereksinimine neden olabilmektedir.^[3] Akciğerdeki değişikliklerin akut respiratuvar distres sendromlu hastalarda görülenlere benzer ve multipl organ yetmezliğinin bir parçası olduğu belirtilmiştir.^[1,18] Oluşan bu patolojik değişikliklere reperfüzyona bağlı olarak gelişen toksik maddelerin neden oldukları ileri sürülmekte

ve bu toksik maddelerin ortadan kaldırılmasını da içeren bir çok tedavi yöntemi iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarını önlemek için kullanılmaktadır.^[18]

Akciğer hasarına neden olan süreçler akciğerden tamamen uzak bir alanda başlar. İskemi reperfüzyon hasarının temelinde reperfüzyon sırasında dokunun oksijenizasyonu sonucu ortaya çıkan oksijen radikalleri bulunmaktadır.^[19] Reaktif oksijen radikalleri birçok kaynaktan salınabilirken bunların arasında en önemli olanı aktive olmuş nötrofillerdir.^[18,20] Reperfüzyon süreci, iskemi alanda oluşan serbest radikallerin sistemik dolaşıma karışmasına neden olur. Bunlar da ya direkt olarak hasarı başlatır ya da indirekt olarak nötrofillerin aktivasyonu ve sitokinlerin üretimi için bir stimulan etki gösterir. Bu mediatörlerin çoğu nötrofil-endoel etkileşimini sağlayarak nötrofillerin dokulara migrasyonuna yol açmakta ve göç eden nötrofiller degranüle olarak dokuya hasar vermektedir.^[18,21,22] Degranülasyon sonrasında artan serbest oksijen radikalleri ile proteazlar akciğer endotel hasarına ve buna bağlı olarak artmış pulmoner kapiller permeabiliteye sebep olurlar.^[23]

Günümüzde iskemi-reperfüzyon sonrasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için süperoksit dismutaz, allopürinol, katalaz, mannitol, vitamin C, pravastatin, alfa tokoferol, L-karnitin, pentoksifilin gibi çeşitli maddeler tedavide denenmiş ve etkili oldukları gösterilmiştir. Bu antioksidan maddelerin ya pulmoner mikrovasküler permeabilite artışı ve nötrofil akümüülasyonunu önleyerek ya da antioksidan sistemi aktive etmek suretiyle, iskemi-reperfüzyon sonrasında ortaya çıkan uzak doku organ hasarına karşı koruyucu etkiye sahip oldukları gösterilmiştir.^[24-29]

Bu çalışmamızda antioksidan etkisi çeşitli çalışmalarda kanıtlanmış olan melatoninin, iskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarını azaltıcı etkisi ve vücutta nötrofil havuzunun %50-60'ını ihtiva etmesi nedeniyle de alt ekstremite iskemi-reperfüzyon hasarından en çok etkilenen uzak organ olarak bilinen akciğerler üzerine koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırdık.

Melatonin direkt radikal giderici bir antioksidandır. Hidroksil radikali, singlet oksijen, peroksil radikali ve süperoksit anyonu gibi organizma için toksik olan serbest oksijen radikalleri ile reaksiyona girerek, bunları vücut için zararsız olan maddelere dönüştürür.^[7,30,31] Melatonin hem yağda hem de suda çözünebildiğinden dolayı vücudun her hücrelerine, sitozole ve mitokondri gibi hücre içerisindeki diğer yapılara kolaylıkla girer. Bu özelliği nedeniyle vitamin ve mineral antioksidanlara göre çok daha etkilidir. Melatoninin E vitamininden iki kat ve glutatyonla göre beş kat daha etkili antioksidan olduğu gösterilmiştir.^[4,32] Ayrıca melatonin süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glukoz-6-fosfat

dehidrojenaz gibi antioksidan enzimleri uyararak ve nitrik oksit sentetaz gibi prooksidatif enzimleri baskılayarak dolaylı antioksidan etki göstermektedir.^[32]

İskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarı ile akciğerlerde oluşan uzak organ hasarının gösterilmesi amacıyla sıklıkla turnike yöntemi kullanılmaktadır.^[33-35] Deneysel iskelet kası iskemisi çalışmalarında turnike uygulamasının yanı sıra aort ve femoral arterlerde geçici olarak kan akımının engellenmesi gibi çeşitli yöntemler de kullanılmıştır.^[36] Ancak bu yöntemlerle tam bir iskeminin sağlanması için kollateral damarların tek tek ligasyonu gerekmektedir bu da çoğu zaman mümkün olamamaktadır. Turnike modeli ise alt ekstremiteye olan kan akımını totale yakın (%98) engellemektedir.^[37] Arteriyel akımdaki bu submaksimal azalmanın insandaki akut arteriyel tıkanma ile benzerlik gösterdiği düşünülmektedir. Biz de çalışmamızda total iskemi oluşturması ve uygulama kolaylığı olması nedeniyle turnike modelini kullandık.

Genel olarak turnike ile iskemi oluşturulan modellerde, iskemi süresi ortalama 2-6 saat, reperfüzyon süresi ise ortalama 1-4 saat arasında tutulmuştur.^[36,38,39] Bizim çalışmamızda da iskemi süresi dört saat, reperfüzyon süresi ise iki saat olarak uygulandı.

İskemi-reperfüzyonda oluşan serbest radikaller yüksek reaktiviteleri nedeniyle membranlardaki lipidlere saldırarak lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Akciğerde iskemi-reperfüzyon hasarı sırasında akümüle olan lipid peroksidasyon ürünü MDA'nın tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) ile verdiği reaksiyon spektrofotometrik olarak ölçülerek akciğer hasarının derecesi hakkında fikir edinilebilir.^[40] Çalışmamızda İ-R grubunda (grup 2) MDA değerinin grup1'e göre anlamlı olarak arttığı, grup 4'te ise anlamlı bir artış olmadığı görüldü. Grup 4'teki artışın grup 2 ve grup 3'e göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanırken, grup 2 ile grup 3 arasında anlamlı bir fark yoktu.

Akciğer dokusu MDA düzeylerinde grup 1 (sham) ile karşılaştırıldığında grup 4'te (prereperfüzyon) belirgin bir artış olmazken grup 2 ve grup 3'te ise istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı artış olduğu görüldü ($p<0.001$). Çalışmamızda tavşanların iki taraflı alt ekstremitelerinde oluşturulan iskemi ve reperfüzyon, akciğer dokusunda MDA seviyelerinin yükselmesine sebep olmuştur. Kontrol grubundaki artmış MDA düzeyleri, histopatolojik çalışmada saptanan hasar skor puanlarıyla iyi bir ilişki göstermiştir. Bu bulgular reperfüzyondan hemen önce melatonin uygulamasının iskemi-reperfüzyon hasarının kan ve akciğer üzerindeki etkilerini azalttığını, iskemiden önce uygulanan melatoninin ise bu hasarı azaltmada etkisiz kaldığını göstermektedir.

Okutan ve ark.^[41] oluşturdukları deneysel aortik iskemi-reperfüzyon (AİR) modellerinde melatonin ver-

dikleri sıçanlarda akciğerlerde nötrofil infiltrasyonunun göstergesi olan miyeloperoksidaz ve doku MDA düzeylerinin AİR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğunu saptamışlardır. Çelik ve ark.^[42] deneysel adneksiyal iske mi-reperfüzyon çalışmalarında, reperfüzyondan hemen önce melatonin uyguladıkları guinea piglerde, kontrol grubuna göre plazma ve akciğer doku MDA düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığını saptamışlardır. İnci ve ark.^[43] ise sıçanlarda deneysel akciğer iske mi-reperfüzyon çalışmalarında reperfüzyondan 10 dakika önce intraperitoneal 10 mg/kg melatonin uygulanmasıyla doku MDA düzeylerinde azalma olduğunu göstermişlerdir.

Akciğerde oluşan iske mi-reperfüzyon hasarını gösterme yöntemlerinden bir diğeri de, histopatolojik preparatların hematoksilen eozin ile boyandıktan sonra ışık mikroskopuyla incelenmesidir.^[12,44] Kapiller yatağa nötrofillerin akümü lasyonu ile birlikte nötrofil birikimi, interstisyel ödem, alveolar septumlarda kalınlaşma, alveolar hava boşlukları içerisinde protein içeren eksuda varlığı sıktır. Aynı şekilde hazırlanan preparatlarda 10 ya da 20 değişik sahanın büyük büyütme altında incelenip polimorfonükleer lökosit sayılarak kantitatif olarak da hasar tespiti mümkün olmaktadır.^[45] Tassiopoulos ve ark.^[12] alt ekstremitte iske mi-reperfüzyon modelinde deksametazon, aminoguanidin verilen sıçanlarda, kontrol grubuna oranla akciğer PNL sayılarının azalmış olduğunu gösterdiler. Aynı çalışmada tedavi uygulanan gruplarda interstisyel ödemin ve konjesyonun kontrol grubuna göre daha az olduğu saptandı. Çeşitli iske mi-reperfüzyon modellerinde melatoninin akciğer PNL akümü lasyonunu azalttığı gösterilmiştir.^[41-43] Bu çalışmada tavşan akciğer örneklerini hematoksilen eozin ile boyandıktan sonra incelediğimizde; PNL yoğunlaşması, ödem ve konjesyon ile belirlenen hasar skorunun iske mi-reperfüzyon grubunda (grup 2) en yüksek olduğunu (2.8), melatonin verilen grup 4'te ise bu değerin (1.5) grup 2'ye göre anlamlı olarak düşük olduğunu saptadık. Bu durum daha önceki çalışmalarla paralellik göstererek melatoninin iske mi-reperfüzyon sonrası oluşan lökosit infiltrasyonunu azaltarak reperfüzyonun uzak organ hasarını önlemede yardımcı olduğunu göstermektedir. Ancak melatoninin iskemiden önce verildiği grup 3'te elde edilen hasar skoru (2.7), grup 2'den farklı değildi. Bu durumun melatoninin yarılanma ömrünün 30 dakika olması nedeniyle verdiğimiz dozun etkisiz kalmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Yapılan bu çalışma sonucunda görülmektedir ki turnike ile alt ekstremitenin iske mi reperfüzyona uğratılması uzak organ olan akciğerlerde konjesyon, lökosit infiltrasyonu ve interstisyel ödem ile karakterize incinmeye, lipid peroksidasyonunda artmaya yol açmaktadır. Reperfüzyon öncesinde melatonin kullanımı akciğerlerdeki bu reperfüzyon hasarını önlemektedir. Bunu da li-

pid peroksidasyonunu önleyerek ve nötrofil infiltrasyonunu azaltarak gerçekleştirmektedir. Ayrıca melatoninin uygun zamanda ve yeterli dozda verilmesi antioksidan etkisinin oluşması için şarttır.

KAYNAKLAR

1. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. Br J Surg 1994; 81:637-47.
2. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. Cardiovasc Surg 2002;10:620-30.
3. Rocker GM. Ischaemia/reperfusion, inflammatory responses and acute lung injury. Thorax 1997;52:841-2.
4. Keleştimur H. İnsanda pineal bezin fonksiyonları. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 1996;10:141-7.
5. Erlich SS, Apuzzo ML. The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. J Neurosurg 1985;63:321-41.
6. Mor M, Plazzi PV, Spadoni G, Tarzia G. Melatonin. Curr Med Chem 1999;6:501-18.
7. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. Eur J Pharmacol 2001;426:1-10.
8. Hardy SC, Homer-Vanniasinkam S, Gough MJ. The triphasic pattern of skeletal muscle blood flow in reperfusion injury: an experimental model with implications for surgery on the acutely ischaemic lower limb. Eur J Vasc Surg 1990;4:587-90.
9. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin Chim Acta 1978;90:37-43.
10. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. Methods Enzymol 1984;105:328-31.
11. Wasowicz W, Neve J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. Clin Chem 1993; 39:2522-6.
12. Tassiopoulos AK, Carlin RE, Gao Y, Pedoto A, Finck CM, Landas SK, et al. Role of nitric oxide and tumor necrosis factor on lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities. J Vasc Surg 1997;26:647-56.
13. Hobson II RW, Milazzo VJ, Duran WN. Pathophysiology of skeletal muscle ischemia - reperfusion injury. In Haimovici H, editor. Vascular Surgery. New York: Blackwell Science; 1996. p. 497-508.
14. Nelson K, Herndon B, Reisz G. Pulmonary effects of ischemic limb reperfusion: evidence for a role for oxygen-derived radicals. Crit Care Med 1991;19:360-3.
15. İşbir S, Akgün S, Ak K, Civelek A, Tekeli A, Çobanoğlu A ve ark. Akut alt ekstremitte iske mi-reperfüzyon hasarının akciğer serbest oksijen radikalleri üzerine olan etkisi. Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg 2000;8:632-4.
16. Harkin DW, Barros D'Sa AA, McCallion K, Hoper M, Campbell FC. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia--reperfusion protects against acute lung injury. J Vasc Surg 2002;35:1264-73.
17. Pararajasingam R, Nicholson ML, Bell PR, Sayers RD. Non-cardiogenic pulmonary oedema in vascular surgery. Eur J Vasc Endovasc Surg 1999;17:93-105.
18. Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. The role of glutamine in skeletal muscle

- ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg* 1999;178:147-50.
20. Cavanagh SP, Gough MJ, Homer-Vanniasinkam S. The role of the neutrophil in ischaemia-reperfusion injury: potential therapeutic interventions. *Cardiovasc Surg* 1998;6:112-8.
 21. Carden D, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol* 1998;275:H385-92.
 22. Windsor AC, Mullen PG, Fowler AA, Sugerman HJ. Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. *Br J Surg* 1993;80:10-7.
 23. Bengisun J, Koksoy C, Bengisun JS, Bayraktaroglu G, Camur A, Aras N. Ischemia and reperfusion injury: prevention of pulmonary hypertension and leukosequestration following lower limb ischemia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997;56:117-20.
 24. Kearns SR, Kelly CJ, Barry M, Abdih H, Condran C, Leahy A, et al. Vitamin C reduces ischaemia-reperfusion-induced acute lung injury. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999;17:533-6.
 25. Berkan Ö, Güneç F, Katrancıoğlu N, Günay İ, Doğan K, Yıldız E. İskemi ve reperfüzyona bağlı olarak ortaya çıkan akciğer hasarını önlemede pentoksifilin, karnitin ve askorbik asidin etkileri. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2002;10:92-5.
 26. Yeniterzi M, Yeşiltay M, Vatansav H, Görmüş N, İskelet kası iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde mannitol etkili mi? *Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2001;17:231-4.
 27. Joyce M, Kelly CJ, Chen G, Bouchier-Hayes DJ. Pravastatin attenuates lower torso ischaemia-reperfusion-induced lung injury by upregulating constitutive endothelial nitric oxide synthase. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001;21:295-300.
 28. Şenkaya I, Ökten B, Saba D, Güven H, Özer Z, Dirican M ve ark. İskelet kası iskemi reperfüzyon hasarının azaltılmasında tiklopidin. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* 1999;7:405-10.
 29. Novelli GP, Adembri C, Gandini E, Orlandini SZ, Papucci L, Formigli L, et al. Vitamin E protects human skeletal muscle from damage during surgical ischemia-reperfusion. *Am J Surg* 1997;173:206-9.
 30. Reiter RJ, Tan DX, Acuña-Castroviejo D, Burkhardt S, Karbownik M. Melatonin: mechanisms and actions as an antioxidant. *Curr Top Biophys* 2000;24:171-83.
 31. Gündüz B. Hidroksil temizleyici bir hormon olarak melatonin. *Gülhane Tıp Dergisi* 1999;41:252-7.
 32. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997;60:2255-71.
 33. Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg* 2002;26:115-21.
 34. Herbert KJ, Hickey MJ, Lepore DA, Knight KR, Morrison WA, Stewart AG. Effects of the endothelin receptor antagonist Bosentan on ischaemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Eur J Pharmacol* 2001;424:59-67.
 35. Tekeli A, Akgün S, Civelek A, İşbir S, Ak K, Çobanoğlu A ve ark. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyonu sonucunda gelişen akciğer hasarının önlenmesinde farklı bir ajan: FK 506 (takrolimus). *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2001;9:242-6.
 36. Şirin H, Sarıbülbül O, Cerrahoğlu M, Aksoy Ö, Baltalarlı A, Saçar M. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyonunun yol açtığı pulmoner hasarda aprotininin koruyucu etkinliği. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2001;9:233-7.
 37. Göktürk EA, Seber S, Özakçe H, Uslu B, Paşaoğlu Ö, Önder E. İskelet kası iskemi-reperfüzyon zedelemesinde dimethyl sulfoxide'in koruyucu etkisi. *Anadolu Tıp Dergisi* 1989;11:173-89.
 38. Yassin MM, Barros D'Sa AA, Parks G, Abdulkadir AS, Halliday I, Rowlands BJ. Mortality following lower limb ischemia-reperfusion: a systemic inflammatory response? *World J Surg* 1996;20:961-6.
 39. Akar H, Sarac A, Konuralp C, Yıldız L, Kolbakir F. Comparison of histopathologic effects of carnitine and ascorbic acid on reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;19:500-6.
 40. Sakamaki F, Hoffmann H, Muller C, Dienemann H, Messmer K, Schildberg FW. Reduced lipid peroxidation and ischemia-reperfusion injury after lung transplantation using low-potassium dextran solution for lung preservation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(4 Pt 1):1073-81.
 41. Okutan H, Savas C, Delibas N. The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion-reperfusion. *Interactive Cardiovasc and Thorac Surg* 2004;3:519-22.
 42. Celik H, Ayar A, Tug N, Simsek M, Ozercan I, Cikim G, et al. Effects of melatonin on noncardiogenic pulmonary edema secondary to adnexial ischemia-reperfusion in guinea pig. *Neuro Endocrinol Lett* 2002;23:115-8.
 43. Inci I, Inci D, Dutly A, Boehler A, Weder W. Melatonin attenuates posttransplant lung ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2002;73:220-5.
 44. Wagner FM, Weber AT, Ploetze K, Schubert F, Pfeiffer S, Albrecht S, et al. Do vitamins C and E attenuate the effects of reactive oxygen species during pulmonary reperfusion and thereby prevent injury? *Ann Thorac Surg* 2002;74:811-7; discussion 817-8.
 45. Tanahashi Y, Takeyoshi I, Aiba M, Ohwada S, Matsumoto K, Morishita Y. The effects of FK409 on pulmonary ischemia-reperfusion injury in dogs. *Transpl Int* 1999;12:402-7.