

Overde İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Melatoninin Etkisi (Ratlarda Deneysel Çalışma)

ISCHEMIA-REPERFUSION DAMAGE IN OVARY AND EFFECTS OF MELATONIN (EXPERIMENTAL STUDY IN RATS)

Hüsnü ÇELİK*, İbrahim ÖZERCAN**, Gürkan ÇIKIM***, Rasim MOĞULKOÇ****, Oğuz ÖZÇELİK*****, Remzi ATILGAN*****

* Y.Doç.Dr., Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD,

** Yrd.Doç.Dr.,Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD,

*** Yrd.Doç.Dr., Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, ELAZIĞ

**** Yrd.Doç.Dr., Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD, KONYA

***** Yrd.Doç.Dr., Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD,

***** Arş.Gör.Dr.,Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, ELAZIĞ

Özet

Amaç: Adneks detorsiyonu ile overlerde oluşturulan iskemik reperfüzyon hasarı ve melatoninin etkisini araştırmak.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada dört gruba ayrılan toplam 28 wistar tipi dişi rat kullanıldı. Tüm ratlarda adneks torsiyonu yapıldı. Grup I (n:6)'de 24 saatlik iskemiden sonra detorsiyon (reperfüzyon) yapılmadan salpingoofektomi yapıldı. Grup II (n:6)'de adneks detorsiyone edildikten sonra herhangi bir uygulama yapılmadı. Grup III (n:8)'de reperfüzyon yapıldıktan sonra 2 cc hacimde 100mg/kg Melatonin (MLT) (Sigma Chemical Co), GrupIV (n:8)'de ise aynı hacimde serum fizyolojik (SF) dört eşit dozda ve 6 saat arayla (0., 6., 12., 18. saatlerde) intraperitoneal (İP) uygulandı. Detorsiyon işleminden 24 saat sonra tüm ratlar dekapite edilerek serum malondialdehit (MDA) düzeyi ve over histopatolojisi yönünden karşılaştırıldı. İstatistiksel yöntem olarak Mann Whitney U testi kullanıldı ve $p < 0.01$ anlamlı kabul edildi. Histopatolojik bulgular ve MDA arasındaki bağıntı incelemesinde spearman bağıntı analizi (r,p,n) kullanıldı.

Bulgular: Grup I histopatolojik skorları (HPS) 5.3 ± 0.5 , MDA düzeyleri 0.38 ± 0.10 , Grup II'de HPS 7.5 ± 1 , MDA düzeyleri 0.58 ± 0.1 olarak bulundu. HPS ve MDA düzeyleri yönünden aralarında anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.005$ ve $p=0.004$). Grup III'de HPS 5.8 ± 0.8 , MDA düzeyi 0.48 ± 0.08 olarak bulunurken GrupIV'de HPS düzeyi 7.3 ± 1 , MDA düzeyi 0.60 ± 0.05 olarak tespit edildi. HPS ve MDA yönünden aralarında anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.002$). MDA düzeyleri ile HPS arasında anlamlı bağıntı bulundu ($r=0.71$, $p=0.00$, $n=28$).

Sonuç: Adneksiyal torsiyon nedeniyle detorsiyon yapılan durumlarda overlerde oluşabilecek iskemik - reperfüzyon hasarında tedaviye melatonin eklenmesi faydalı olabilir.

Summary

Objective: It was purposed to examine the effects of melatonin supplementation on ischemia-reperfusion damage in ovary induced by adnexal detorsion.

Material and Methods: In the present study 28 female wistar rats were used in which divided 4 groups. Adnexal torsion was created by twisting the adnexa to all of the rats. In Group I (n=6): adnexes were extirpated without detorsion (reperfusion), following 24 hours ischemia period. In Group II (n=6): only adnexal detorsion was created without saline and melatonin application. In Group III (n=8): After reperfusion, 2 cc volume containing 100mg/kg melatonin (MLT) (Sigma Chemical Co) was injected intraperitoneally, in Group IV (n=8): 2 cc volume of saline was divided in four equal doses and injected intraperitoneally every 6 hours (0., 6., 12., 18. hours). Following 24 hours reperfusion period, all the rats were decapitated and their serum malonyldialdehyde (MDA) levels and ovary histopathological examination were compared. Statistical significance between the groups were examined by Mann Whitney U test ($p < 0.01$). The correlation between MDA levels and the score of histopathologic examination were made Spearman Correlation Analysis (r,p,n) method.

Results: The histopathologic score (HPS) and MDA levels in Group I were 5.3 ± 0.5 , 0.38 ± 0.10 nmol/ml, respectively. In Group II, HPS and MDA levels were found 7.5 ± 1 and 0.58 ± 0.1 nmol/ml, respectively. There was statistically significant differences between HPS and MDA levels ($p=0.005$ and $p=0.004$, respectively). In Group III, HPS was 5.8 ± 0.8 and MDA level was 0.48 ± 0.08 nmol/ml. In Group IV, HPS and MDA levels were found to be 7.3 ± 1 and 0.60 ± 0.05 nmol/ml, which were statistically different from the group III ($p=0.001$, $p=0.002$, respectively). In addition, the correlation between MDA and HPS was statistically significant ($r=0.71$, $p=0.00$, $n=28$).

Conclusion: The results of present study show that the melatonin supplementation has an important effect on prevention of ischemia-reperfusion damage in ovary induced by adnexal detorsion.

Anahtar Kelimeler: Over, İskemi-reperfüzyon, Melatonin

Key Words: :Ovary, Ischemia-reperfusion, Melatonin

T Klin Jinekolo Obst 2002, 12:73-77

T Klin J Gynecol Obst 2002, 12:73-77

Bir dokunun belirli bir süre iskemiyeye maruz kaldıktan sonra tekrar kanlanması sonucu iskemiyeye reperfüzyon hasarı ortaya çıkar (1). Yapılan çalışmalarda iskemiyeye maruz kalan dokularda esas hasarın dokunun tekrar kanlanmasıyla ortaya çıkan toksik metabolik ürünlere bağlı geliştiği ortaya konmuştur (2, 3). Yine serbest radikal önleyicilerin kullanılmasıyla dokudaki hasarın azaldığı ve reperfüzyon hasarının biyokimyasal belirteci olan MDA düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir (4,-6).

Jinekoloji literatüründe iskemiyeye reperfüzyonunun sık karşılaştığı bir durum adneksal torsiyonlarda yapılan detorsiyon uygulamalarıdır. Bu konuda yapılmış deneysel çalışmalarda adneks detorsiyonuyla oluşturulan reperfüzyona bağlı olarak antioksidan aktivitenin azaldığı gösterilmiştir (7). Bu bilgiler ışığında overleri koruyucu amaçla yapılan detorsiyon uygulamalarında oluşabilecek iskemiyeye reperfüzyon hasarını azaltabilmek amacıyla tedaviye bir antioksidanın eklenmesi düşünülebilir.

Bu çalışmada overlerde oluşturulan iskemiyeye reperfüzyon hasarının biyokimyasal ve histopatolojik bulgularına güçlü bir antioksidan olarak bilinen (6, 8, 9) MLT'in (N - acetyl-5-methoxytryptamin) etkileri araştırıldı.

Materyal Metod

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum, Fizyoloji, Patoloji ve Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışma ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen, deney öncesi aynı ortamlarda tutularak yem ve suları *ad libitum* olarak verilen ve günlük yapılan vaginal smearlarında düzenli siklus gösterdiği tespit edilen wistar tipi 28 adet dişi rat üzerinde gerçekleştirildi. Ratlar randomize, prospektif tek kör çalışma programında rastgele seçilerek oluşturulan dört gruba ayrıldı.

Grup I (n:6): 24 saat iskemiyeye sonrası detorsiyon yapılmadan salpingoofektomi yapıldı.

GrupII (n:6): 24 saat iskemiyeye sonrası detorsiyon yapıldı. Herhangi bir uygulama yapılmadı.

Grup III (n:8):24 saat iskemiyeye sonrası detorsiyon yapıldı ve İP MLT verildi.

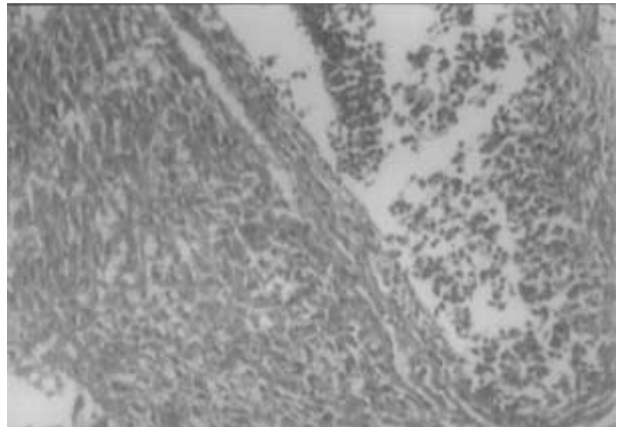
GrupIV (n:8): 24 saat iskemiyeye sonrası detorsiyon yapıldı ve İP SF verildi.

Deney: Tüm ratlarda intramusküler 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar,Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 5 mg/kg Xsilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, İstanbul, Türkiye) ile genel anestezi sağlandı. Prone (yüzü koyu yatar şekilde) pozisyonunda, asepti-antisepti şartlarına uyularak, orta hattın bir cm sağından cilt ve kas dokusu geçilerek ratların sağ adnekslerine ulaşıldı. Sağ adneksleri uterin hornların üst ucundan tubayı ve overi besleyen damarları içine alacak şekilde kendi etrafında 360-720 derece

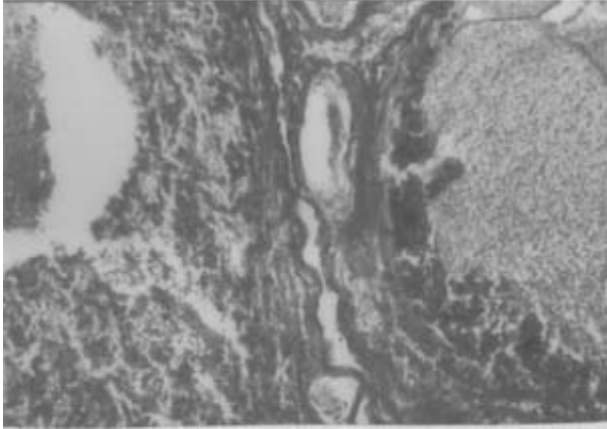
arasında döndürüldü. Tosiye edilen adneks cerrahi ipek suture (5/0, Ethicon, UK, Edinburgh) ile kas dokusuna tespit edildi. İşlem sonrası cilt 5/0 ipek ile suture edildi. Bütün gruplara profilaktik amaçlı 100 mg/kg ampisilin İP uygulandı.

Grup I'de 24 saatlik iskemiyeye bağlı histopatolojik değişiklikler ve MDA düzeyini tespit etmek için reperfüzyon yapılmadan salpingoofektomi yapıldı ve dekapite edilerek kanları alındı. Kalan üç grupta tekrar anestezi sağlandı ve torsiyone edilen adneks daha önceki ipek tespitten kurtularak detorsiyone (reperfüzyon) edildi. Grup II'de adneks detorsiyone edildikten sonra herhangi bir uygulama yapılmadı. Grup III'de reperfüzyondan hemen önce 1/90 oranında etanol-SF karışımında çözündürülerek hazırlanmış olan 100mg/kg MLT (Sigma Chemical Co), GrupIV'de ise aynı miktarda SF reperfüzyon ile birlikte başlamak üzere dört eşit dozda ve 6 saat arayla (0., 6., 12., 18. saatlerde) intraperitoneal uygulandı. Detorsiyon işleminden 24 saat sonra Grup II,III,IV'deki ratlar dekapite edilerek kanları alındı ve detorsiyone edilmiş adneksler çıkarıldı. Alınan salpingoofektomi materyalleri %10 formalinle tespit edildi.

Histopatolojik değerlendirme: Çıkarılan salpingoofektomi materyallerinden izole edilen overler rutin işlemlerden geçirilerek parafine gömüldü. Overin değişik kısımlarından elde edilen 3 mikrometre kalınlığındaki kesitler hemotoxilen-eozin ile boyandı. Her over için dört kesit Olympus BX-50 marka ışık mikroskopunda nekrozun yaygınlığını gösteren histopatolojik bulgular yönünden incelendi. Nekroz yaygınlığı için ordinal skala oluşturuldu. Nekroz yokluğuna (yok: 0 puan), yer yer nekroze alanların (var: 1 puan) ve yaygın nekroze alanların varlığına (çok var : 2 puan) göre skorlandı (Şekil 1, 2). Farklı skorların olduğu alanlarda en büyük skor değerlendirmeye alındı. Aynı overe ait kesitlerdeki skorlar toplandı.



Şekil 1. Overde folikül duvarı ve stromada yer yer nekroze alanlar Histopatolojik skor : 1 puan).



Şekil 2. Overde folikül duvarı ve stromada yaygın nekroz (Histopatolojik skor : 2 puan).

rak her denek için toplam skorlar tespit edildi ve değerlendirilmeler bu skorlar üzerinden yapıldı.

MDA düzeyleri: Düz cam tüpe alınan kan örneklerinden elde edilen serumlar spektrofotometrik olarak (Schimadzu UV-1201) çalışıldı. Değerler nmol/ml olarak belirlendi.

İstatistik değerlendirme: Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde histopatolojik skor (HPS) değerleri ve MDA düzeyleri yönünden gruplar arası karşılaştırma yapıldı. Bu karşılaştırmada Kruskal wallis varyans analizi kullanıldı, $p < 0.05$ bulunması üzerine Mann Whitney U testi ile ikili karşılaştırma yapıldı. $p < 0.01$ anlamlı kabul edildi. HPS ile MDA düzeyleri arasında spearman bağıntı analizi yapıldı (r,p,n). İstatistik işlemlerde ve grafiklerde SPSS 9.0 for Windows yazılım programı kullanıldı

Bulgular

Deney boyunca kullanılan deneklerin hiçbirinde ölüm görülmedi. Operasyon süresi her rat için 6.2 ± 1 dakika olup benzer bulundu. Torsiyone edildikten 24 saat sonra yapılan ikinci laparatomide torsiyone edilmiş adnekslerin tamamı makroskopik olarak siyah nekrotik görünümde idi. Yirmidört saat reperfüzyon süresini takiben yapılan ikinci laparatomide detorsiyone edilmiş adneksler makroskopik olarak yer yer siyah nekrotik görünüm ile birlikte vişne ve açık soluk pembe renkli alanlar içeren görünüme sahipti.

Mikroskopik düzeyde yapılan incelemede tüm overlerde ödem, dokularda ayrışma, polimorf nüveli lökosit infiltrasyonu gibi iskemi ve reperfüzyona ait histopatolojik bulgular mevcuttu.

Tüm grupların overdeki nekroz yaygılığını gösteren HPS ve serum MDA düzeyleri Tablo 1’de gösterildi. Grupların HPS skorları ve MDA değerleri arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

İkili karşılaştırmalarda Grup I’in HPS’ları ve MDA düzeylerinin Grup II değerleriyle karşılaştırılmasında anlamlı farklar tespit edildi (sırasıyla $p = 0.005$ ve $p = 0.004$). Grup I’in III ile karşılaştırmalarında yine anlamlı farklar bulundu ($p = 0.005$, $p = 0.004$). Grup I ile IV’ün karşılaştırmasında ise anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.01$).

Detorsiyondan sonra herhangi bir uygulama yapılmayan Grup II değerlerinin Grup III ile karşılaştırmasında hem MDA hem de HPS yönünden anlamlı bir fark bulunamazken (sırasıyla $p > 0.01$, $p > 0.01$) Grup II ile IV’ün karşılaştırmasında fark anlamlıydı (sırasıyla $p = 0.001$, $p = 0.002$). Grup III ile IV’ün karşılaştırmasında yine anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p = 0.001$, $p = 0.002$).

MDA düzeyleri ile HPS arasında anlamlı ilişki bulundu ($r: 0.71$, $p: 0.00$, $n: 28$), (Şekil 3).

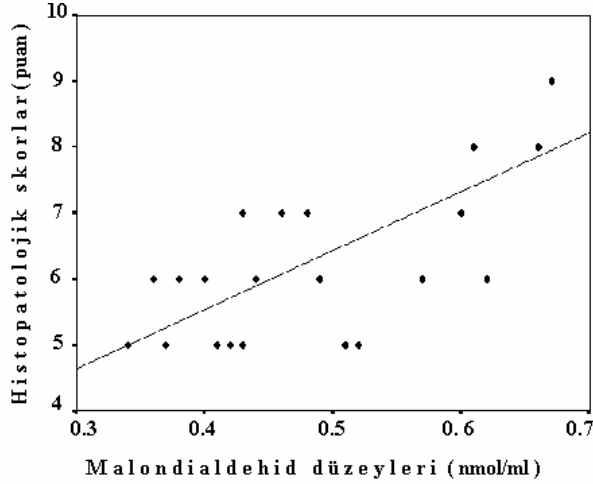
Tartışma

Adneks torsiyonu genel olarak üreme çağındaki kadınlarda görülür (10). Bu sebeple yapılacak girişimin adneksiyal yapılar yönünden koruyucu olması önemlidir. Torsiyone olan adneksin detorsiyone edilerek tedavi edilmesi bir yandan overin korunmasını amaçlarken diğer yandan iskemi-reperfüzyonu sonucu oluşan serbest oksijen radikal artışına bağlı değişiklikleride beraberinde getirmektedir. Daha önceki çalışmalarda iskemiye bırakılan dokuda hasar daha az iken esas hasarın iskemik dokunun yeniden kanlanmasıyla ortaya çıkan serbest oksijen radikallerine bağlı olduğu bildirilmiştir (1,2). Serbest radikaller lipid proksidasyonu denenen bir reaksiyonla lipitler, membranlar, enzimler, nükleik asit ve polisakaritler üzerinde toksik etki oluşturarak çeşitli doku hasarına ve hücre ölümüne yol açarlar (11). Organizmada serbest oksijen radikallerinin olumsuz etkilerini azaltan, kısmen yada tamamen önleyen antioksidan mekanizmalar mevcuttur (12). Taskın O. ve

Tablo 1. Gruplardaki HPS ve serum MDA düzeyleri (Ortalama \pm standart sapma)

	n	Histopatolojik skor (puan)	Serum MDA düzeyi (nmol/ml)
GrupI (I)	6	5.3 \pm 0.5	0.38 \pm 0.10
GrupII (I/R)	6	7.5 \pm 1	0.58 \pm 0.1
GrupIII (I/R +SF)	8	7.3 \pm 1	0.60 \pm 0.05
Melatonin IV (I/R+MLT)	8	5.8 \pm 0.8	0.48 \pm 0.08

I : İskemi, I/R : İskemi-Reperfüzyon



Şekil 3. Over dokusunda reperfüzyona bağlı oluşan histopatolojik değişiklik ile serum malondialdehit arasındaki bağıntı ($r:0.71$, $p:0.00$, $n:28$).

arkadaşları tarafından yapılan çalışmada iskemiye bırakılan overde reperfüzyonundan sonra 36. saatte antioksidan aktivitenin azaldığı gösterilmiştir (5).

Güçlü bir antioksidan olarak bilinen melatoninin daha önceki bir çok çalışmada serbest radikal hasarını önlediği ve doku hasarının biyokimyasal değerlendirilmesinde lipit peroksidasyonunun güvenilir bir göstergesi olan MDA düzeylerini doku ve plazmada azalttığı gösterilmiştir (7,13, 4, 14). Melatonin hem direk etkisiyle hemde glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitesini artırarak sertbest radikal hasarını azaltmaktadır (15, 16, 7, 6).

Çalışmamızda, iskemiden sonra adnekslerin reperfüze edilmeden çıkarıldığı deneklerden elde edilen kan MDA düzeyleri ve overe ait HPS'ların iskemiden sonra reperfüze edilen grup değerleri ile karşılaştırılmasında reperfüzyonun doku hasarını arttırdığı tespit edildi. İskemiden sonra reperfüzyona bırakılan overlerde MLT uygulaması SF 'e göre overdeki HPS'lar ve serum MDA düzeylerinin daha düşük bulunmasını sağladı. Bu sonuçlarımız MLT uygulamasının MDA düzeyi ile birlikte histopatolojik düzelmeye sağladığını bildiren literatür ile uyumludur (4).

Adneks torsiyonuyla ilgili deneysel çalışmalar sınırlı sayıda olmakla birlikte Taskin O. ve ark. nin ratlarda yaptığı çalışmada iskemiye bırakılan overlerde 4 - 24 saatte normal histolojik bulgulara rastlanırken 24 - 36 saatlerde infarkt tespit edildiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada reperfüzyon yapılanlarda ise 4 - 24 saat iskemiye bırakılanlarda over dokusu bütünlüğünü korurken 36 saatlik iskemiden sonra yapılan reperfüzyonun adneksiyal nekroz ile sonuçlandığını bildirmiştir (7). Bu çalışma ile histopatolojik sonuçlarımız zıtlık içerisinde görülmekle

birlikte mevcut çalışmada histopatolojik değişikliklerin incelenmesi konusunda net bir ifade kullanılmamıştır. Biz çalışmamızda overin mümkün olabildiğince farklı bölgelerini ortaya koyabilmek amacıyla değişik kısımlarından aldığımız bütün kesitleri değerlendirmeye aldık. 3µm olan kesitlerimizde yaptığımız incelemede tespit ettiğimiz nekroz alanlarının tamamı bölgeseldi. Çalışmamızda iskemi ve reperfüzyona ait, nispeten geri dönüşümlü olan ödem, dokularda ayrışma, lökosit infiltrasyonu gibi bulgular skorlanmadı. Skorlamada iskeminin dokularda yaptığı en son düzeyde ve geri dönüşümsüz histopatolojik değişiklik olan nekroz bulgusu kullanılmıştır.

Sonuç olarak; Çalışmamızda reperfüzyonun overlerdeki bölgesel nekroz alanlarını artırarak histopatolojik skorlarda kötüleşmeye neden olduğu gösterilmiştir. Reperfüzyona bırakılan dokularda MLT uygulaması histopatolojik skorlarda düzelmeye neden olmuştur. Adneks torsiyonlarında yapılan koruyucu girişimlerde postoperatif dönemde tedaviye MLT eklenmesi faydalı olabilir. Bununla birlikte benzer çalışmaların diğer antioksidanlar ve farklı iskemi-reperfüzyon sürelerinde, farklı türlerde yapılması, uzun dönem etkilerinin incelenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. Br J Surg 1994; 81: 637 - 47.
2. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surg Clin North Am 1992;72:65-83.
3. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. A J Physiol 1986; 250 : 749-53.
4. Kazez A, Demirbag M, Ustundag B, Ozercan IH, Saglam M. The role of melatonin in prevention of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. J Pediatr Surg 2000 ; 35:1444 - 8.
5. Kaneko S, Okumura K, Numaguchi Y, Matsui H, Murase K, Mokuno S, Morishima I, Hira K, Toki Y, Ito T, Hayakawa T. Melatonin scavenges hydroxyl radical and protects isolated rat hearts from ischemic reperfusion injury. Life Sci 2000; 67:101-12
6. Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. Biol Signals Recept 2000 ; 9:160-71.
7. Taskin O, Birincioglu M, Aydin A, Buhur A, Burak F, Yilmaz I, Wheeler JM The effects of twisted ischaemic adnexa managed by detorsion on ovarian viability and histology: an ischaemia-reperfusion rodent model. Hum Reprod 1998; 13 : 2823 - 7.
8. Pierrefiche G, Laborit H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. Exp Gerontol 1995 ; 30 : 213-27.
9. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza yayınları Konya 1995; 3-95.
10. Hibbard LT. Adnexal torsion. Am J Obstet Gynecol. 1985; 15; 152 : 456 - 61.
11. Köse K, Doğan P. Lipit peroksidasyonu. Erciyes Tıp dergisi. 1992; Ek-1; 340-50.
12. Halliwell B, Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? The Lancet 1994 ; 344 : 721-4.

13. Czyrko C, Steigman C, Turley DL, Drott HR, Ziegler MM. The role of reperfusion injury in occlusive intestinal ischemia of the neonate: malonaldehyde-derived fluorescent products and correlation of histology. *J Surg Res.* 1991 ;51 :1 - 4.
14. Kaya H, Oral B, Ozguner F, Tahan V, Babar Y, Delibas N. The effect of melatonin on lipid peroxidation during radiotherapy in female rats. *Strahlenther Onkol.* 1999 ; 175 : 285-8.
15. Pablos MI, Reiter RJ, Chuang JI, Ortiz GG, Guerrero JM, Sewerynek E, Agapito MT, Melchiorri D, Lawrence R, Deneke SM. Acutely administered melatonin reduces oxidative damage in lung and brain induced by hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* 1997 ; 83:354-8.
16. Ustundag B, Kazez A, Demirbag M, Canatan H, Halifeoglu I, Ozercan IH. Protective effect of melatonin on antioxidative system in experimental ischemia-reperfusion of rat small intestine. *Cell Physiol Biochem* 2000;10:229-36.

Geliş Tarihi: 16.02.2001

Yazışma Adresi: Dr.Hüsnü ÇELİK
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, ELAZIĞ