

***İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULAN RATLARDA MELATONİNİN BÖBREK FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

THE EFFECT OF MELATONIN ON RENAL FUNCTION OF IN RATS DURING ISCHEMIA/ REPERFUSION INJURY

**Mustafa NİSARİ¹, Neriman İNANÇ¹, Meltem SOYLU¹, Yağmur YAŞAR²,
Eda BAŞMISIRLI¹, Mustafa KAVUTÇU³**

¹Nuh Naci Yazgan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Kayseri

²Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Kayseri

³Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, Ankara

ÖZ

Amaç: Serbest oksijen radikalleri iskemi/reperfüzyon (I/R) esnasında patofizyolojik doku değişimlerine neden olmaktadır. Bu çalışmada deneysel iskemi/reperfüzyonun sıçan böbreklerinde yol açtığı oksidatif hasara karşı güçlü bir antioksidan olan melatoninin böbrek fonksiyonları ve böbrek hasarı üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 200-250 g ağırlığında 28 adet dişi Wistar albino rat kullanıldı. Ratlar rastgele 4 gruba ayrıldı (n=7). Kontrol grubu (K): Hayvanlara herhangi bir ilaç enjeksiyonu ya da I/R işlemi yapılmadı. I/R grubu: Herhangi bir ilaç enjeksiyonu yapılmadan sol renal arter 45 dakika iskemiye maruz bırakıldı ve iskemiden çıkarılıp reperfüzyonundan emin olduktan sonra kapatılarak, 24 saat yaşamalarına izin verildi. Melatonin grubu (Mel): Hayvanlara, 25 mg/kg dozunda melatonin i.p olarak enjekte edildi ve I/R işlemi uygulanmadı. I/R+Mel grubu: Gruptaki tüm hayvanlara 25 mg/kg dozunda melatonin i.p olarak enjekte edilecek ve enjeksiyondan 30 dakika sonra hayvanlar 45 dakika iskemiye sokuldu, iskemiden sonra reperfüzyonunda 24 saat yaşamasına izin verildi. Serumda Üre (BUN), Kreatinin (CRE) aktivitelere, ürik asit, aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) seviyeleri değerlendirildi.

Bulgular: I-R grubundaki üre, kreatinin, AST ve ALT seviyeleri K, M ve IR+M gruplarındaki seviyelerden daha yüksek olup istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0.001). Bu durum böbreklerde İ/R hasarının oluştuğunu göstermektedir.

Sonuç: Çalışma sonuçları iskemiye bağlı böbrek hasarının azaltılmasında Mel uygulamasının koruyucu etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: İskemi, melatonin, serum, rat

ABSTRACT

Objective: Oxygen free radicals are considered to be important components involved in the pathophysiological tissue alterations observed during ischemia/reperfusion. In this study, we investigated the protective effect of melatonin, potent antioxidant, on kidney functions and damage during the experimental renal ischemia reperfusion injury in rats.

Materials and Methods: In this study we used 28 female wistar albino rats 200-250 g. The animals were randomly divided into 4 groups (n=7). Control group (C): They were fed with only standard rat diet and tap water. I/R group: Rats were subjected to 45 min of renal pedicle occlusion followed by 24 hours reperfusion. Melatonin group (Mel): Melatonin (25 mg/kg i.p) was administered. I/R+Mel group: Melatonin (25 mg/kg i.p) was administered 30 min prior to ischemia and immediately before the reperfusion period. Rats were subjected to 45 min of renal pedicle occlusion followed by 24 hours reperfusion. Urea, uric acid and levels of creatinine, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) in serum were evaluated.

Results: Urea, uric acid creatinine, AST, and ALT levels in the I-R group were higher than those in C, Mel, and I/R+Mel groups were found to be statistically significant (p<0.001). In this case, renal I/R injury showed that the damage to the kidneys.

Conclusions: These results show that treatment with Mel may prevent the kidney tissues damages due to ischaemia.

Keywords: Ischemia, melatonin, serum, rat

*Türk Biyokimya Derneği Biyokimya Günleri 02-05 Kasım 2016, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas, p-71. Poster olarak sunulmuştur.

Makale Geliş Tarihi : 24.04.2018
Makale Kabul Tarihi: 21.11.2018

Corresponding Author: Mustafa NİSARİ, Dr. Nuh Naci Yazgan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü

e-mail: mnisari@nny.edu.tr

Telefon no: 0532 6455212/ 0 (352) 324 0000

GİRİŞ VE AMAÇ

Organa gelen arteriyel veya venöz kan akımının yetersiz gelmesi veya durmasına iskemi denir. İskemi sonucunda dokunun hipoksiye girmesiyle doku hasarı ortaya çıkar. Reperfüzyon ise dokunun kanlanmasının yeniden başlamasıdır (1). İskemi, hücrel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadır. İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekmektedir. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasarlara yol açmaktadır (2). Böbrek iskemisi böbrek transplantasyonu, kısmi nefrektomi, kardiyopulmoner bypass, sepsis, çeşitli ürolojik girişimler ve hidronefrozis gibi çeşitli klinik durumlarda görülmektedir. İskemiden sonra gelişen akut böbrek yetmezliği, glomerüler filtrasyon hızında azalma, tübüler nekroz ve böbrek damarlarında direnç artışıyla karakterizedir (3).

Serbest oksijen radikallerinin potansiyel zararlarına karşılık çok sayıda hücre koruyucu enzimleri ile karşı koyulur ve antioksidan maddeler ile radikal hasarı sınırlandırılmaya çalışılır. Vücuttaki hücrel antioksidan enzimler, antioksidan maddeler ve serbest radikallerin birbirleri arasındaki ilişki bir denge oluşturmaktadır (3,4).

İskemi ve reperfüzyon sonucu oksidatif stres oluşmaktadır. Dokularda oluşan oksidatif stresin sonucunda oluşan serbest oksijen radikallerinin potansiyel zararlarına karşılık endojen ve ekzojen antioksidanlar bulunmaktadır (1,5). Endojen antioksidanlardan biri olan melatonin, Lerner ve arkadaşları tarafından 1958'de pineal bezde keşif edilmiştir (6).

Melatonin (5-methoxy-N-acetyl-tryptamine), memelilerde başlıca pineal bezden ayrıca over, lens ve kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur. Melatonin pineal bezde triptofandan sentezlenerek, karanlıkta salgılanır ve plazma proteinlerine bağlanır ve karaciğerde metabolize olur (7,8). Melatonin, yaşlanma-karşıtı bir molekül olup, kimyasal karsinojenlere karşı DNA'nın korunması, endokrin ritmin düzenlenmesi, bazı antigonadotropik etkilerin açığa çıkarılması, sinir sistemi üzerinde koruyucu etkilerin oluşturulması, immün sistemin uyarılması ve serbest radikallerin giderilmesi gibi birçok fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde görev alır. Melatoninin farklı organ ve dokularda direkt serbest radikal yakalayıcı ve indirekt antioksidan etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (9,10). Serbest oksijen radikalleri iskemi/reperfüzyon (I/R) esnasında patofizyolojik doku değişimlerine neden olmaktadır. (1) .Bu çalışmada deneysel I/R'nin sıçan böbreklerinde yol açtığı oksidatif hasara karşı güçlü bir antioksidan olan melatoninin böbrek fonksiyonları ve böbrek hasarı üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

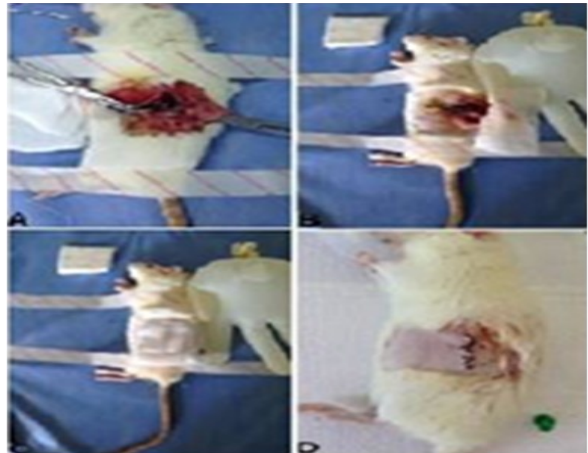
GEREÇ-YÖNTEM

Çalışmada ağırlıkları 200-250 g, 28 adet dişi Wistar Albino türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele seçilerek her grupta 7 rat olacak şekilde kontrol (K), iskemi/reperfüzyon (I/R), melatonin (M) ve melatonin+iskemi/reperfüzyon (M+I/R) olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

Cerrahi ve deneysel protokol

Çalışmamızda ağırlıkları 200-250 g, 28 adet dişi Wistar Albino türü sıçan kullanıldı. Sıçanların, 80 mg/kg dozda ketaminhidroklorid (Ketalar, Pfizer, Groton, CT) ve 10 mg/kg ksilazinhidroklorid (Rompun; Bayer, Leverkusen, Germany) kombine intraperitoneal injeksiyonu ile derin anestezisi sağlandı. Sıçanın sol tarafında son kaburganın altından başlayarak aşağıya doğru traşlanarak deri görünür hale getirildi. Sıçan düz bir satıha sağ tarafı üzerine yatırılarak sabitlendi. Sıçanın sol tarafında son kaburganın altında parmakla palpe ederek böbreğin yeri tespit edildikten sonra traşlanan bölgeye steril spançla batikon sürüldü. Steril bisturi ve pens yardımıyla yukarıdan aşağıya doğru 2-3 cm'lik bir insizyon açıldı. Bisturi ucuyula karın boşluğuna girilerek makas yardımıyla insizyon alanı böbreğin çıkabileceği boyuta getirildi. Pens yardımıyla yağ dokusu ile beraber böbrek de dışarı çıkartıldı.

Daha sonra böbreğin üzerindeki yağ dokusu temizlenerek renal damar görünür duruma getirildi. Böbreğe zarar vermeden damara 38 mm'lik buldog damar klempsi yerleştirilerek 45 dakikalık iskemi başlatıldı. Operasyon bölgesinin üzerine steril spanç yerleştirildi. İskemi boyunca sıçanın iç organlarının su kaybetmemesi için spanç 3-5 dk aralıklarla vücut sıcaklığındaki steril serum fizyolojikle ıslatıldı. Derin anestezi boyunca vücut ısısının düşmemesi için hayvanın karın ve sırt bölgesine sıcak su balonları kondu. Operasyon sırasında anesteziden çıkma belirtileri (göz kapağı refleksinin hızlanması kas uyarısının artması vb) gösteren hayvanlara 40 mg/kg dozda ketamine i.p verilerek anestezinin devamı sağlandı. İskemi süresi tamamlandıktan sonra damar klempsi çıkartıldı. Reperfüzyonu başladıktan sonra yağ dokusu ile birlikte böbrek karın boşluğu içerisine yerleştirildi. İnsizyon dikilmeye başlanmadan önce, karın içi organların anatomik konumlarına yerleşmelerini kolaylaştırmak amacıyla karın boşluğuna vücut sıcaklığına getirilmiş 1-2 ml steril serum fizyolojik döküldü. Deri altı bağ dokusunun ve kas tabakasının dikilmek suretiyle kapatılması için atravmatik iğneli 6-0 nolu Vicryl (emilebilir) kullanıldı. Deri altı bağ dokusu ve kas dokusu basit sürekli dikişlerle kapatıldı. Deri dikişleri için travmatik iğneli 4-0 nolu Vicryl kullanılarak basit ayrı dikişlerle deri kapatıldı. Sızıntı kanaması olup olmadığı kontrol edilip kanama olmadığı belirlendikten sonra dikiş hattı batikonla silindi (Şekil 1,2).



Şekil 1: A-Böbreğin karın boşluğundan çıkarılışı, B-renal damara buldogun yerleştirilmesi, C-İskemiyin başlaması, D-Reperfüzyon sonra sıçanın dikilmesi

Deney sonucunda sıçanlar anestezi altında biyokimya analizleri için kan alındıktan sonra sakrifiye edildi



Şekil 2: A-Sıçanın sakrifiye edilmesi, B-Sıçandan kanın alınması, C-Böbrek, D-Böbreğin kesilerek formaline konulması

Çalışma Grupları

Kontrol grubu (K: n=7): Hayvanlara herhangi bir ilaç enjeksiyonu ya da I/R işlemi yapılmadı. I/R grubu (n=7): Herhangi bir ilaç enjeksiyonu yapılmadan sol renal arter 45 dakika iskemiye maruz bırakıldı ve iskemiden çıkarılıp reperfüzyonundan emin olduktan sonra kapatılarak, 24 saat yaşamalarına izin verildi.

Melatonin grubu (Mel n=7): Hayvanlara, 25 mg/kg dozunda melatonin i.p olarak enjekte edildi ve I/R işlemi uygulanmadı.

I/R+Mel grubu (n=7): Gruptaki tüm hayvanlara 25 mg/kg dozunda melatonin i.p olarak enjekte edildi ve enjeksiyondan 30 dakika sonra hayvanlar 45 dakika iskemiye sokuldu, iskemiden sonra reperfüzyonunda 24 saat yaşamasına izin verildi.

Serum biyokimya analizleri

Serumların biyokimya analizleri için deney hayvanların kalbinden kan alınarak jelli tüplere aktarıldı. Daha sonra 600 g'de 10 dakika santrifüj edilerek her bir hayvan için serum elde edildi. Elde edilen serumlarda karaciğer

(aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT)) ve böbrek (Üre (BUN), ürik asit ve kreatinin) fonksiyon testleri yapıldı.

İ

STATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda nicel değişkenler için Kruskal Wallis testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırma için Dunn testi kullanıldı. Verilerin analizi TURCOsa (Turcosa Analytics Ltd Co, Turkey, www.turcosa.com.tr) istatistik yazılımında gerçekleştirilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Kontrol grubunda üre miktarı ortalama 47.8, kreatin 0.5, AST 134.7, ALT 86.9, ürik asit oranı ise 1.7 olduğu belirlendi. I-R grubunda ise üre'nin değeri 86.2, kreatin 0.9, AST 346.2, ALT 128.7, ürik asit ise 3.0 olarak belirlendi. Bu iki grup arasındaki fark değerlendirildiğinde böbrek hasarı oluşturulan I-R grubunda doğal olarak beklenen biyokimya değerlerinde artma görüldü. Melatonin grubunda üre 55.8, kreatin 0.9, AST 156.6, ALT 92.0 ve ürik asit değerinin 2.2 olduğu görüldü. Kontrol grubuna göre melatonin verilen grupta bu değerlerin az miktarda arttığı görülmektedir. I-R+Melatonin grubunda ise sonuçların üre 74.2, kreatin 0.8, AST 178.1, ALT 106.2, ürik asit değerinin de 2.2 olduğu görüldü. Kreatin değerlendirildiğinde kontrol grubu ile I/R grubu arasında anlamlı bir fark varken melatonin grubu arasında I/R grubundaki değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman, anlamlı olarak arttığı görüldü ($p < 0.001$) (Tablo 1).

TARTIŞMA-SONUÇ

Böbrek iskemisi; böbrek nakilleri, kısmi nefrektomi, kardiyopulmoner bypass, sepsis, gibi çeşitli klinik durumlarda görülmektedir. İskemiden sonra gelişen akut böbrek yetmezliği, böbrek hücrelerinin hasarına ve ölüme neden olmaktadır (2). Serumdaki üre, kreatinin ve AST'nin artması böbrekteki reperfüzyon hasarını göstermektedir. AST hem karaciğer hem de böbrek dokusunda da bulunmaktadır. Sıçanlarda renal tübüler hasardan sonra özellikle AST yükselmesi proksimal tübülüsün içinde bulunması da hücre hasarının nonspesifik bir belirteci olarak da değerlendirilmektedir (11).

Böbrek I/R hasarına bağlı olarak böbrek fonksiyon bo-

Tablo 1: Kontrol ve deney gruplarına ait 1. ve 3. çeyrek ortanca değerleri ve grupların karşılaştırılması

Gruplar	Üre (BUN) mg/dl	Kreatin mg/dl	AST U/L	ALT U/L	Ürik asit
Kontrol	47.8(46.6-48.6) ^a	0.5(0.5-0.6) ^{a,c}	134.7(133.5-136.6) ^{a,d}	86.9(85.4-88.6) ^{a,c}	1.7(1.5-1.8) ^a
I/R	86.2(84.5-87.3) ^b	0.9(0.8-0.9) ^b	346.2(345.3-347.5) ^b	128.7(128.0-130.3) ^b	3.0(2.8-3.2) ^b
Melatonin (25mg)	55.8(55.0-56.4) ^{a,c}	0.9(0.5-0.7) ^c	156.6(154.5-159.1) ^{c,d}	92.0(90.7-93.2) ^{c,d}	2.2(1.7-2.5) ^a
I/R+Melatonin	74.2(73.3-75.8) ^{b,c}	0.8(0.7-1.0) ^b	178.1(176.6-179.1) ^{b,c}	106.2(105.3-107.1) ^{b,d}	2.0(1.9-2.1) ^a
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Veriler ortanca(1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı sütunda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler farklılığı ifade etmektedir.

zıkluğu plazma üre, kreatinin, seviyelerindeki ve serum AST aktivitesindeki artış tübüler nekroz gelişmeden önceki aşamada yükselme göstermektedir. Serumdaki üre ve kreatinin seviyelerindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$) ve tübüler engellenme veya tübüllerde geriye sızdırmadan kaynaklandığını düşündürmektedir (12).

Şentürk ve ark. (2010), *Silybummarianum* deneysel renal I/R sırasında oluşan hasar üzerine koruyucu etkilerini biyokimyasal olarak araştırdıkları çalışmalarında IR gruplarında üre miktarında artış olduğunu bu durumun böbrek işlevinde bir düzensizliğin olduğunu rapor etmişlerdir (13).

Yapmış olduğumuz çalışmada üre miktarında artış gözlenmesi böbrek fonksiyonunda değişimlere neden olması yönünden bu çalışma ile benzerlik göstermektedir (13).

Serumdaki ürik asit artışının akut böbrek yetmezliğine yol açtığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda da IR grubunda kontrole göre anlamlı artışın olduğunu ve melatonin uygulanan gruplarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Bu durum I/R sonucunda oluşan akut böbrek yetmezliğini önleyebileceğini göstermektedir (14). Özellikle I/R sonrasında serumdaki ürenin artması akut böbrek yetmezliğini, kreatinin yükselmesi böbrek proksimal tübül hücrelerinde fonksiyon bozukluğunu, AST düzeylerindeki yükselmenin böbrek hasarı sonucu olduğu bildirilmektedir (3,4). Yapmış olduğumuz çalışmada I/R sonrasında serumda yüksek olan üre, kreatinin, ürik asit, ALT ve AST değerleri melatonin tedavisi ile anlamlı derecede azaldığını dolayısıyla I/R hasarında etkili bir koruma sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, melatonin diğer pek çok antioksidan ile kıyaslandığında gerek güçlü radikal süpürücü etkisi gerek antioksidan enzim aktivitelerini artırıcı özelliği ile güncelliğini korumaktadır.

KAYNAKLAR

1. Ozan E, Koyutürk L, Sapmaz T. Böbrek iskemireperfüzyon hasarında antioksidan olarak prostoglandin E1 (PGE1) kullanımının incelenmesi: Deneysel çalışma. Fırat Tıp Dergisi 2004; 9:67-67.
2. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surg Clin North Am, 1992; 72: 65-83.
3. Conesa LE, Valero F, Nadal JC, et al. N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. Am J Physiol 2001; 281:730-773.
4. Charles DC, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemiareperfusion injury. Anesthesiology 2001; 94:1133-1138.
5. Reiter R. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. FASEB J 1995; 9:526-533.
6. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J Amer Chem Soc 1958; 80:2587
7. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, et al. Review of the evidence supporting melatonin's role as an

- antioxidant. J Pineal Res 1995; 19:149-165.
8. Altun A, Vardar A, Altun BU. Melatonin ve Kardiyovasküler Sistem. Anadolu Kardiyoloji Dergisi 2001; 1:283-288.
9. Yildirim Z, Kotuk M, Erdogan H, et al. Preventive effect of melatonin on bleomycin-induced lung fibrosis in rats. J Pineal Res 2006; 40:27-33.
10. Aydoğdu N, Kanter M, Erbaş H, Kaymak K. Kadmiyuma bağlı karaciğer hasarında taurin, melatonin ve asetilsisteinin nitrik oksit, lipid peroksidasyonu ve bazı antioksidanlar üzerindeki etkileri. Erciyes Tıp Dergisi 2007; 29:089-096.
11. Özdamar MY, Yurtçu M, Toy H, Aköz M, Günel E. Renal iskemireperfüzyon hasarında üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstrelerinin etkisi. Genel Tıp Derg 2010; 20:1-5.
12. Karimi G, Ramezani M, Tahoonian Z. Cisplatin nephrotoxicity and protection by milk thistle extract in rats. Evid Based Complement Alternat Med 2005; 383-386.
13. Şentürk H, Kolankaya D, Sahin Y. Renal iskemireperfüzyonu sırasında sıçan böbreğinde oluşan oksidatif stres hasarına Silimarin Etkisi. Çankaya University Journal of Science and Engineering 2010; 7:59-74.
14. Roncal CA, Mu W, Croker B, et al. Effect of elevated serum uric acid on cisplatin-induced acute renal failure. Am J Physiol. Renal Physiol 2006; 116-122.