

Pinealektomili ratlarda yara iyileşmesi

Mehmet Özler (*), Kemal Şimşek (**), Turgut Topal (*), Şükrü Öter (*), Ahmet Korkmaz (*)

ÖZET

Yara iyileşmesi, karmaşık bir tamir sürecidir. Melatonin güçlü antioksidan etkilerinin yanında, birçok sistemik etkisi de olan ve gece karanlığında salgılanan bir moleküldür. Biz çalışmamızda pinealektomi yaparak melatonin bazal salgısının kronik dönemde bozulmasının yara iyileşmesi üzerindeki etkisini incelemeyi amaçladık. Çalışmada 14 adet Sprague-Dawley erkek sıçan kullanıldı. İki eşit gruba ayrılan deney hayvanlarının bir grubuna pinealektomi prosedürü uygulandı. Pinealektomiden 15 gün sonra anestezi altında tüm gruplardaki deney hayvanlarının sırt kısmında 6 adet eksizyonel cilt yarası oluşturuldu. Sekiz gün sonra anestezi altında yara yüzey alanları ölçümü yapıldıktan sonra yara dokuları alındı. Bu dokularda malondialdehid (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve hidroksiprolin (OH-proline) ölçümleri yapıldı. Pinealektomi yapılması yara dokularında MDA düzeylerini artırırken ($p < 0.05$), SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinde farklılığa neden olmadı. Pinealektomi yapılmış deney hayvanlarının yara dokusunda OH-prolin miktar azalmış olarak bulundu ($p < 0.05$). Benzer olarak pinealektomi grubunda yara yüzey alanının anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p < 0.05$). Çalışmamız melatonin bazal salgısının yara iyileşmesi için gerekli ve önemli olduğunu göstermiştir. Melatoninin yara iyileşmesi sırasındaki bu olumlu etkisi yara iyileşmesi esnasında artan oksidatif strese karşı antioksidan sistemi güçlendirmesine bağlı olabilir.

Anahtar kelimeler: Melatonin, oksidatif stres, pinealektomi, yara iyileşmesi

SUMMARY

Wound healing in pinealectomized rats

Wound healing is a complex repairing process. Melatonin which is secreted in darkness at night is a molecule that has both antioxidant and systemic effects. In our study, by making pinealectomy, we aimed to investigate how chronically impaired basal secretion of melatonin affected wound healing process. In this study 14 Sprague-Dawley male rats were used. These rats were separated into two groups, and pinealectomy was performed to one of these groups. Six excisional skin wounds were opened on dorsal part of all rats under anesthesia 15 days after pinealectomy. Wound tissues were excised under anesthesia after the measurement of wound area eight days later. Measurements of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and hydroxyproline (OH-proline) were made in these tissues. Excision of the pineal body caused increase in MDA levels in the wound tissues ($p < 0.05$), whereas it caused no differences in the activities of SOD and GSH-Px enzymes. The level of OH-proline was found to be decreased in the wound tissues of the rats performed pinealectomy ($p < 0.05$). Similarly, the wound area was found to increase significantly in this group ($p < 0.05$). Our study has demonstrated that basal secretion of melatonin is necessary and important for wound healing. Positive effects of melatonin during wound healing can derive from that its strengthening effect on antioxidant system against oxidative stress which increases during healing process.

Key words: Melatonin, oxidative stress, pinealectomy, wound healing

* GATF Fizyoloji Anabilim Dalı

**GATF Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı

Aynı basım isteği: Dr. Kemal Şimşek, GATF Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı, Etlik-06018, Ankara

E-mail: drkemsim@gmail.com

Makalenin geliş tarihi: 27.04.2010 • **Kabul tarihi:** 09.06.2010

Giriş

Yara iyileşmesi cerrahi işlemler ya da travmalardan sonra ortaya çıkan iyi organize olmuş bir tamir sürecidir. Yara iyileşmesi esnasında çok değişik faktörler iyileşmeyi etkiler. Doğal olarak bu faktörlere bağlı olarak meydana gelebilecek aksaklıklar iyileşme sürecini bozabilir. İyileşmenin bozulduğu yaralar gerek hasta, gerekse hekim açısından önemli bir sorun teşkil eder; bu sorun her yıl binlerce insanı etkileyerek milyonlarca dolarlık sağlık harcamalarına neden olmaktadır (1). Yara iyileşmesinin normal süreci üzerinde birçok çalışma yapılmasına rağmen hala tam olarak aydınlatılmayan kısımları mevcuttur. Buna melatonin örnek verebiliriz. Son yıllarda popüleritesi giderek artan ve üzerinde birçok çalışma yapılan melatonin molekülünün yara iyileşmesindeki fizyolojik etkisi tam olarak incelenmemiştir. Yara iyileşmesinin fizyolojik düzenlenmesinin tam olarak anlaşılabilmesi iyileşme sürecinin normal seyrinden çıktığı durumlarda müdahaleyi kolaylaştıracaktır.

Yaralanmadan hemen sonra inflamasyonla başlayan iyileşme süreci, yeni doku oluşumu ve olgunlaşma evresi ile devam eder. İnflamasyonun erken evresinde salgılanan kemotaktik faktörlerin etkisi ile dolaşımdan bol miktarda nötrofil ve makrofaj yara bölgesine gelir. Yara bölgesine gelen bu hücreler ve çevre dokuda mevcut fibroblast gibi diğer hücrelerin katkısı ile iyileşme gerçekleşir. Görev alan hücrelerin koordine bir şekilde çalışması ile kollajen sentezi ve kontraksiyonu gerçekleşerek yara kapanır. Dolaşım veya herhangi bir metabolik problemi olmayan bir zeminde oluşacak yara iyileşmesi, kendi dinamik sürecinde kısa sürede iyileşmeyle sona erecektir (2).

Melatonin, başlıca pineal bezde üretilen, gece karanlıkta salgılanan bir hormondur ve biyolojik ritimler, cinsel olgunlaşma, üreme, uyku, duygu durumu, immünite gibi birçok biyolojik olayla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bunun yanında, çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, güçlü antioksidan etkisi gösteril-

miştir (3). Melatoninin, süperoksid anyonu, hidroksil radikali, peroksinitrit gibi reaktif molekülleri süpürme yeteneğinin olması süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu uyarması nedeniyle bu antioksidan özelliğinin çok yönlü olarak ortaya çıkmasına neden olmaktadır (4).

Yara iyileşmesi birçok hücre ve sitokinin rol aldığı multifaktöryel yeniden yapılanma sürecidir. Bu nedenle iyileşmeye katkısı olabilecek birçok faktörün araştırılması bu süreçte büyük önem taşımaktadır. Biz de bu çalışmada, yaptığımız pinealektomi grubu ile melatonin bazal salgısının yara iyileşmesine olan etkisini incelemeyi amaçladık. Planladığımız bu çalışma ile yaklaşık 15 günlük (kronik) melatonin siklusu bozulmuş deney hayvanlarında iyileşmede meydana gelebilecek değişiklikleri incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya kurumumuz “hayvan deneyleri etik kurulu” tarafından etik onay verilmesinden sonra başlanmıştır. Çalışmada 14 adet 200–250 g Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanılmıştır. Deney hayvanları çalışma süresince aynı laboratuvar koşullarında tutulmuş, ticari sıçan yemi ve normal musluk suyuyla beslenmiştir.

Cerrahi yöntem: Çalışmanın birinci aşamasında deney hayvanları rasgele olarak iki eşit gruba ayrıldı. Pinealektomi grubu olarak belirlenen deney hayvanları ketamin+ksilazin (85+12.5 mg/kg) anestezisi altında karınları üzerine yatırılarak kafa derisi orta hat boyunca bisturi yardımıyla kesildi. Transvers ve sagittal sütürlerin kesişim noktası ortaya çıkarıldı ve bu noktayı içine alan kemik flebi oluşturuldu. Kemik flebi kaldırıldıktan sonra dura, süperiyor sagittal ve transvers sinüslerin kesişim noktasından yarım ay şeklinde kesildi. Kesilen dura ince bir penset yardımıyla kaldırıldı. Daha sonra pineal bez tutularak çıkartıldı. Kemik flebi yerine konularak kafa derisi 3/0 atravmatik ipek ile suture edildi (5). Pinealektomi yapılan deney hayvanları 15 gün kendi haline bırakıldı. Bu sürenin sonunda tüm hayvanlar sırtları (dorsal bölümleri) yukarıda kalacak şekilde karın üzerine yatırılarak sabitlendi. Sırt bölgelerinde iki skapula arasından iliak çıkıntılara kadar uzanan alan traş edildi. Bu bölge antiseptik solüsyonla (Polyod, Drogan, Ankara) temizlenerek steril koşullar altında yara oluşturma işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla deney hayvanlarına, 6 mm’lik punch biyopsi (Acupunch, ABD) aleti ile 6’şar adet tam kat cilt yarası açıldı. Yara oluşturulmasından sonra 7 gün kendi haline bırakılan deney hayvanları, 8. gün yara dokuları alınmak üzere anestezisi altına alındı. Anestezisi altındaki deney hayvanları karınları üzerine yatırılarak şeffaf bir

naylona yara sınırları çizilerek aktarıldı. Daha sonra bu çizimler milimetrik kağıt yardımı ile ölçülerek sayısal veriler haline getirildi ve yara yüzey alanları hesaplandı. Daha sonra kalplerinden kan alınarak feda edilen deney hayvanlarının yara dokuları bisturi ve ince cerrahi makas yardımıyla, mümkün olduğunca yara sınırında kalınarak çıkarıldı. Çıkarılan tüm dokular ependorf tüplere alınarak sıvı nitrojen içerisinde hızla donmaları sağlandı. Donmuş olan dokular fosfat tampon içinde homojenizatör (Heidolph Diax 900, Almanya) kullanarak homojenize edildi. Homojenatlar 2 ya da 3 küçük tüpe bölünerek ölçümün yapılacağı zamana kadar -80 °C derin dondurucuda saklandı.

Biyokimyasal analizler: Bütün kimyasallar Sigma-Aldrich (ABD) ve Merck (Almanya) firmasından tedarik edildi. Bütün reaktifler ölçümlerin yapılacağı gün hazırlandı ve kullanılacağı ana kadar +4 °C buzdolabında saklandı.

İlk olarak sıçır serum albumininin standard olarak kullanıldığı Lowry ve ark.nın tarif ettiği yöntem ile protein miktarı belirlendi (6). Ölçülen protein değerleri diğer biyokimyasal değerlerin hesabında kullanıldı.

Lipid peroksidasyon miktarı tiobarbiturik asid reaksiyonunun kullanıldığı Ohkawa ve ark.nın tarif ettiği yöntem ile ölçüldü (7). Bu yöntemde malondialdehidin (MDA) 535 nm’de tiobarbiturik asid ile reaksiyonu sonucunda meydana gelen renk değişimi spektrofotometrik yöntemle ölçülmektedir. Sonuçta MDA seviyeleri mmol/g-protein olarak hesaplandı.

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi nitroblue tetrazolium kullanılarak Sun ve ark.nın tarif ettiği yöntem ile ölçüldü (8).

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enziminin aktivitesi, Paglia ve Valentine’nin tarif ettiği yöntem ile hesaplanmıştır. Bu yöntemde Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidasyonu 340 nm’de spektrofotometrik olarak takip edilmektedir. Dakikadaki mmol NADPH oksidasyonu eğimi hesaplandıktan sonra GSH-Px aktivitesi U/g-protein olarak belirlendi (9).

OH-prolin miktarı Reddy ve Enwemeka tarafından tarif edilen yöntem kullanılarak ölçüldü (10). 560 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülen OH-prolin absorbansları, sonunda µg/g protein olarak hesaplanarak ifade edildi.

Tüm istatistiksel analizler SPSS11.0 (SPSSFW, SPSS Inc., Chicago, IL., USA) istatistik paket programı ile yapılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda nonparametrik bir yöntem olan “Mann Whitney-U” testi kullanıldı. p<0.05 bulunduğu sonuç anlamlı olarak kabul edildi.

Tablo I. Yara dokusu oksidan ve antioksidan parametreleri (Ortanca (dağılım))

Gruplar	MDA (mmol/g prot)	SOD (U/g prot)	GSH-Px (U/g prot)
Kontrol	0.368 (0.32-0.83)	294.824 (239.04-394.29)	13.643 (13.21-18.13)
Pinealektomi	1.180 (0.69-1.58) ^a	287.366 (262.25-322.44)	10.661 (7.16-13.85)

^a: Kontrol grubuna göre anlamlı artma ya da azalma (p<0.05)

Bulgular

Yara dokusu oksidatif stres parametreleri: Pinealektomi yapılmış ratlarda yara dokularında MDA düzeyleri anlamlı olarak artarken (p<0.05), antioksidan enzimler olan SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinde farklılık bulunamamıştır (Tablo I).

Yara dokusu OH-Prolin ve yüzey alanı değerleri: Pinealektomi yapılmış deney hayvanlarının yara dokusunda OH-prolin miktarı anlamlı olarak azalmıştır (p<0.05). Yara yüzey alanları pinealektomi grubunda anlamlı olarak artmıştır (p<0.05) (Tablo II, III) (Şekil 1).

Tablo II. Yara dokusu OH prolin düzeyleri (Ortanca (dağılım))

Gruplar	OH-prolin (µg/g protein)
Kontrol	280.294 (202.99-787.70)
Pinealektomi	158.068 (115.38-166.38) ^a

^a: Kontrol grubuna göre anlamlı artma ya da azalma (p<0.05)

Tablo III. Yara yüzey alanı (Ortanca (dağılım))

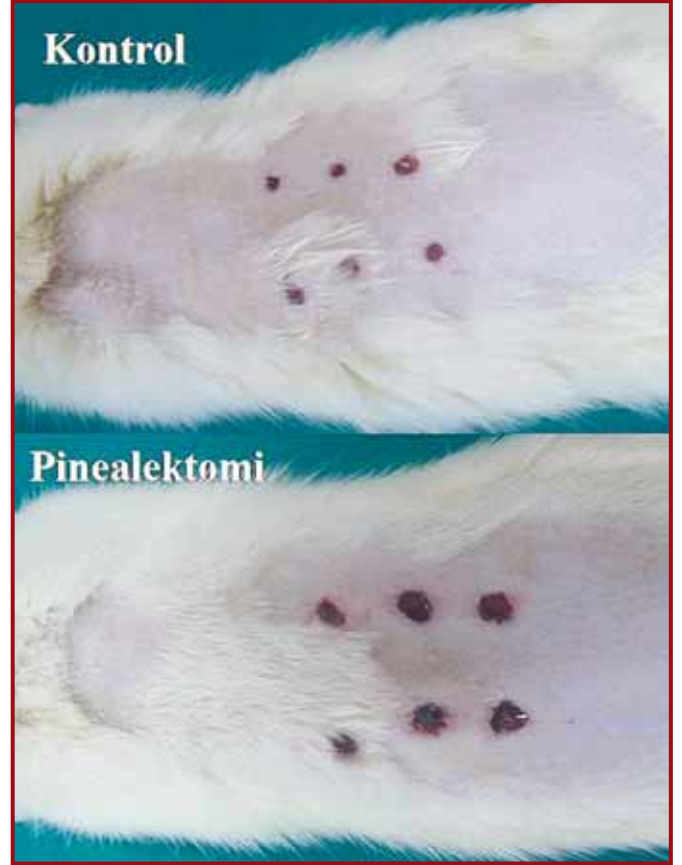
Gruplar	Yara yüzey alanı (mm ²)
Kontrol	2.00 (1.00-6.00)
Pinealektomi	3.25 (2.00-13.00) ^a

^a: Kontrol grubuna göre anlamlı artma ya da azalma (p<0.05)

Tartışma

İnsanoğlu yüzyıllardır yara iyileşmesi ile ilgilenmektedir. Eski Mısır'da bulunan Ebers papirüslerinden bir kısmı yara tedavisi ile ilgilidir. Günümüzde, yaşam süresinin uzaması ve gelişen cerrahi uygulamalar sonucunda artan yara iyileşmesi bilgilerine ihtiyaç araştırma çalışmalarına hız kazandırmıştır. Geçen yüzyılda neredeyse tüm yaralar komplikasyonlu bir şekilde iyileşirken, günümüzde yara iyileşmesi ile ilgili komplikasyonlar azalmıştır. Buna rağmen literatürde kronik yara olarak bahsedilen iyileşmesi zor olan yaralar hala hekimlerin önünde bir problem olarak durmaktadır.

Oksidatif stres varlığında antioksidan SOD ve GPx enzim aktivitelerinin arttığı bilinmektedir (11). Steiling ve ark. tarafından farelerde yapılan yara iyileşmesi çalışmasında, yara dokusunda oksidatif stresle birlikte SOD ve GPx seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca iyileşme esnasında artan antioksidan enzim ekspresyonunun iyileşme esnasında artan oksidatif strese uyum amacıyla arttığı değerlendirilmiştir (12). Yara bölgesi-



Şekil 1. Kontrol ve pinealektomi gruplarında 8. güne ait ait örnek yara görünüşleri

ne gelen lökositler bakterileri öldürmek için oksidatif patlama denilen NADPH oksidaz enziminin kullanıldığı bir reaksiyon ile reaktif oksijen türevleri sentezini gerçekleştirir (13). Görüldüğü gibi yara iyileşmesi esnasında bazal bir antioksidan enzim ekspresyonu uyarımı mevcuttur. Çalışmamızda pinealektomi yapılan grupta yara MDA düzeyi bu sonuçlarla uyumlu olarak artmıştır. Yara dokusunda baktığımız antioksidan enzimlerde kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Çalışmamızda artan MDA düzeyiyle uyumlu bir antioksidan enzim artışının olmadığı görülmektedir. Bu bulguyu melatoninsiz ortamda artan oksidatif strese uyumun bozulması olarak yorumlayabiliriz. Pinealektomi ile hayvanları endojen melatonin salgısından yoksun bırakmanın çeşitli dokularda başlı başına bir oksidatif stres kaynağı olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin, Baydaş ve ark. pinealektomili sıçanların beyin ve karaciğer dokularındaki

MDA düzeylerinin arttığını ve GSH-Px düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir (14). Yara iyileşmesi esnasında artan oksidatif strese karşı artması beklenen antioksidan enzimler muhtemelen melatonin eksikliğine bağlı olarak artmamıştır.

Bağ dokusunun ana molekülü kollajendir. Kollajen yapımı ekstrasellüler matriksin anjiogenezis ve doku şekillenmesi için uygun hale gelmesini sağlayan temel basamaktır. Bu nedenle yara iyileşmesini değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisi yara kollajen düzeyini belirlemektir. Genellikle doku kollajen miktarını belirlemek için kollajenin yapısında bol miktarda bulunan ve başka proteinlerin yapısına çok az giren OH-prolin düzeyinin belirlenmesi sık kullanılan bir yöntemdir (15).

Melatoninin yara iyileşmesi üzerindeki etkisi konusundaki literatür bilgilerinde tam bir uyumluluk yoktur. Drobnik ve ark. sıçanların sırtında oluşturdukları yaralarda doza bağlı olarak melatonin uygulamalarının kollajen miktarında azalmaya neden olduğu, pinealektomi yapılan hayvanların yara dokularında ise artmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir (16). Bulbuller ve ark. pinealektominin yara iyileşmesi üzerine etkisini inceledikleri bir başka çalışmada, melatoninin yara iyileşmesini geciktirdiği ve kollajen sentezini azalttığını bulmuşlardır (17). Bu bulguların tersine melatoninin kollajen sentezini artırdığı, böylece yara iyileşmesini artırdığını bildiren çalışmalar da mevcuttur. Pugazhenthı ve ark. ratlarda yaptıkları yara iyileşmesi çalışmasında melatoninin indüklenabilir nitrik oksid sentaz enziminin miktarını azalttığını, anjiyogenez ve kollajen sentezini artırdığını, böylece yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermişlerdir (18). Bizim çalışmamızda OH-prolin düzeyleri incelendiğinde, pinealektomi grubu değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Pinealektomi yapılan grupta yara yüzey alanı anlamlı olarak yüksek kalmıştır. Böylece pinealektomi grubunda kollajen sentezi ile görülen iyileşme sürecindeki geri kalma yara yüzey alanı ile de doğrulanmıştır.

Sonuç olarak, çalışmamızda pinealektomi ile melatoninin bırakılan deney hayvanlarında yara iyileşmesinin uzadığı gösterilmiştir. Böylece çalışmamız ile yara iyileşmesinde melatoninin önemli bir rol aldığı gösterilmiştir. Muhtemelen melatoninin yara iyileşmesine olan katkısı yara iyileşmesi esnasında artan oksidatif strese karşı antioksidan sistemi desteklemesinden kaynaklanmaktadır. Melatoninin bu olumlu etkisinin büyüme faktörleri ya da metallaoproteinazlar üzerinden de olabileceği düşünüldüğünde, bu ayrımı yapmak için karşılaştırmalı çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir. Sonuçta bu çalışma ile melatoninin yara iyi-

leşmesi esnasında oksidatif strese uyumda önemli bir rol üstleniyor olabileceği görüldü.

Kaynaklar

1. Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Loeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117: 35-41.
2. Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci* 2009; 122: 3209-3213.
3. Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 383-410.
4. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnecki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 1129-1146.
5. Fieckineli PA, Waynforth HB. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. 2nd ed. Smith Kline Beecham Pharmaceutical UK. Academic Press, 1992: 284.
6. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
7. Okhawa H, Ohshi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
8. Sun Y, Oberley LW, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
9. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
10. Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem* 1996; 29: 225-229.
11. Mate's JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153: 83-104.
12. Steiling H, Munz B, Werner S, Brauchle M. Different types of ROS-Scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* 1999; 247: 484-494.
13. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117: 12S-34S.
14. Baydas G, Gursu MF, Yilmaz S, et al. Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neurosci Lett* 2002; 323: 195-198.
15. Hendriks T, Mastboom WJB. Healing of experimental intestinal anastomoses (parameters of repair). *Dis Colon Rectum* 1990; 33: 891-901.
16. Drobnik J, Dabrowski R. Melatonin suppresses the pinealectomy-induced elevation of collagen content in a wound. *Cytobios* 1996; 85: 51-58.
17. Bulbuller N, Dogru O, Yekeler H, Cetinkaya Z, Ilhan N, Kirkil C. Effect of melatonin on wound healing in normal and pinealectomized rats. *J Surg Res* 2005; 123: 3-7.
18. Pugazhenthı K, Kapoor M, Clarkson AN, Hall I, Appleton I. Melatonin accelerates the process of wound repair in full-thickness incisional wounds. *J Pineal Res* 2008; 44: 387-396.