


İyonize Radyasyon Uygulaması Yapılmış Rat Pineal Bezi Üzerinde Melatoninin Koruyucu Etkisi Var mıdır? Kronobiyolojik ve Elektron Mikroskopik Çalışma

Çiğdem ELMAS *  Deniz ERDOĞAN * Güleser GÖKTAŞ * Canan ULUOĞLU **
Yıldız GÜNEY *** Gül ÖZBEY ** Ayşe HIÇSÖNMEZ **** Berna YÜCEL **
Seçil ÖZKAN ***** Dila ŞENER *

* Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, TR-06490 Ankara - TÜRKİYE

** Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, TR-06490 Ankara - TÜRKİYE

*** Ankara Üniversitesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, TR-06100 Ankara - TÜRKİYE

**** Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı, TR-06100 Ankara - TÜRKİYE

***** Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, TR-06490 Ankara - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2012-7404

Özet

Çalışmamızda, tüm vücuda uygulanan iyonize radyasyonun, sıçan pineal bezinde yaptığı ince yapı düzeyindeki dejeneratif değişiklikler ve melatoninin (MLT) olası koruyucu etkisi, elektron mikroskopik ve kronobiyolojik olarak araştırılmıştır. Bu amaçla toplam 48 adet erkek Wistar albino sıçan kullanılmıştır. Araştırmamızda, kontrol (K), tüm vücut radyasyon (TVR) ve tüm vücut radyasyon+melatonin (TVR+MLT) grupları, sabah ve akşam olmak üzere günün iki farklı saatinde çalışılarak toplam 6 deney grubu oluşturulmuştur. TVR grubundaki deneklere 8 Gy subletal (öldürücü dozun altında) radyasyon, 60Co (sağaltıcı aygıt Chisostat, açığa çıkarma hızı 0.29 Gy.dak-1) kaynağı ile deneklerin derilerinden 80 cm uzaklıktan, akşam (21.00) ve sabah (09.00) uygulanmıştır. MLT ise radyasyon verilmesinden önce (10 mg/kg), hemen sonra (20 mg/kg) ve 24 saat sonra (10 mg/kg) olmak üzere intraperitoneal olarak uygulanmıştır. İnce yapı düzeyinde mitokondriyon ve pinealosit çapları ölçülmüş ve organel özellikleri histolojik olarak değerlendirilmiştir. Radyasyon uygulamasından en çok akşam grubunun etkilendiği ve melatoninin bu dejeneratif etkileri ortadan kaldırdığı, çok büyük bir farklılık olmamakla beraber TVR+MLT sabah grubunun daha iyi durumda olduğu saptanmış ancak, iki melatonin grubu arasında anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir. Farklı organeller açısından olsa da, sıçan pineal bezinin, iyonize radyasyonun neden olduğu zedelenmeye akşam daha duyarlı olduğu, buna karşın, MLT uygulamasının oluşturduğu sağaltıcı etkide, sabah ve akşam arasında bir fark olmadığı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Melatonin, Radyasyon, Pineal bez, Elektron mikroskobu, Kronobiyoloji

Has Melatonin Protective Effects on Irradiated Rat Pineal Gland? Cronobiologic and Electron Microscopic Study

Summary

In this study, effect of whole body ionizing irradiation on pineal gland in rats and possible protective effects of melatonin (MLT) were investigated by chronobiological and electron microscopic methods. For this purpose 48 male Wistar rats consisting of 6 group that were; control (morning and evening groups), whole body irradiation (WBI) (morning and evening groups), whole-body irradiation+melatonin (WBI + MLT) (morning and evening groups) were used. WBI group exposed to sublethal (below the lethal dose) irradiation dose of 8 Gy using 60Co source (Chisostat therapeutic device, revealing rate 0.29 Gy.dak-1) focusing of 80 cm away from the skin in morning (09.00 am) and evening (09.00 pm). Melatonin administered intraperitoneally immediately before (10 mg/kg), after (20 mg/kg) and 24 h after (10 mg/kg) whole body irradiated rats. Ultrastructurally, mitochondria and pinealocyte diameters measured and organelle properties were evaluated histologically. Evening groups were the most affected groups by application of irradiation. However, melatonin administration considerably inhibited these degenerative changes. Although there was not any significant differences between two melatonin groups, WBI + MLT morning group was better than that of evening group. We thought that, although in different organelles, rat pineal gland was more sensitive to irradiation in evening than morning. However, we did not find any significant difference between therapeutic effect of MLT administration in morning and evening groups.

Keywords: Melatonin, Irradiation, Pineal gland, Electron microscopy, Chronobiology



İletişim (Correspondence)



+90 312 2024648



00cigdem@gmail.com

GİRİŞ

Pineal bez başta endokrin sistem olmak üzere organizmadaki pek çok sistemin işlevlerini gündüz ve gece değişimlerine göre düzenleyen nöroendokrin bir dokudur¹. Hipotalamusda bulunan suprakiazmatik çekirdek (SKÇ) yolağı ile biyolojik bir saat gibi işlev görür^{2,3}. Bu özelliği ile organizmayı oluşturan dokuların işlevsel zamanlamasını ölçer ve düzenler. Pineal bez vücudun diğer yapılarına sirkadyan ritimle ve bezin karanlıkta salgıladığı melatonin (MLT) hormonu aracılığı ile zamanlama sinyalleri gönderir. Bu şekilde üreme başta olmak üzere yılın mevsimsel farklılıklarına ve gündüz ile gece değişimlerine göre vücuttaki fizyolojik olaylar düzenlenir³. Pineal bezin işlev görebilmesinde nörolojik uyarmı, aydınlık ve karanlık önemli rol oynar. Aydınlık ve karanlık, bezden melatonin hormonunun salgılanmasında son derece önemlidir⁴. Karanlık melatonin sentezini uyarır, aydınlık ise baskılar. Işık uyarıları retinanın fotoreseptörleri ile algılanarak retinohipotalamik yol ile hipotalamusdaki SKÇ'ye ulaşır⁵. Melatonin salgılanmasının sirkadyan ritmi, bu çekirdek tarafından düzenlenmektedir^{3,4}. SKÇ, algılanan ışığın miktarına göre melatonin sentezini baskılar⁵.

Radyoterapi hedef dokular dışında çevredeki normal dokularda da inflamatuvar bir süreci başlatmakta, bölgeye lökosit infiltrasyonu olmakta ve radyasyonla indüklenen lipid peroksidasyonu sonucunda serbest radikaller oluşmaktadır⁶⁻⁸. Organizmanın bu süreçle savaşta, antioksidan sistemleri devreye soktuğu bilinmektedir⁹. Yapılan araştırmalar melatoninin, antioksidan defans sistemlerinden biri olduğunu göstermektedir¹⁰⁻¹². Diğer yandan, organizmadaki birçok fonksiyon düzenli olarak tekrarlayan bir organizasyon içinde olup, bu değişiklikler "biyolojik ritimler" olarak adlandırılmaktadır. Melatoninin diurnal (gün içi) salgılanma ritmi de bunlardan biridir. Lökositler tarafından serbest radikal oluşumunun¹³ ya da sıçanlarda pineal bez tarafından da salgılanan ve antioksidan bir enzim olan süperoksit dismutaz aktivitesinin diurnal bir ritmi olduğu gösterilmiştir¹⁴.

Melatonin, pineal bezde triptofan aminoasidinden sentezlenen ve bezin işlev görmesine aracılık eden son derece güçlü bir antioksidandır. Sadece suda çözünen C vitamini ya da yağda çözünen E vitamininin aksine her iki ortamda da çözünebilir ve yine bu iki antioksidandan ayrıcalıklı olarak kan beyin bariyerini geçebilir. Melatoninin tavsiye edilen günlük dozu olmamakla birlikte diğer antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve 5 yıl gibi uzun süre kullanımda bile toksik bir etki göstermemektedir¹⁵. Yiyeceklerden direkt olarak alınmaz ancak hindi gibi triptofan aminoasidinden zengin besin maddeleri tüketildiğinde vücuttaki sentezi artar. Sentetik melatonin kaynakları da güvenle tüketilmektedir¹⁵. Uyku bozuklukları, otizim, alzheimer, AIDS, epilepsi, kardiyovasküler hastalıklar ve hatta kanser tedavisinde etkili olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Güçlü antioksidan özelliğinin yanı sıra melatoninin radioprotektif (ışın-koruyucu) etkisi olduğu da bilinmektedir. Daha önce sıçan ince bağırsağında, akciğe-

rinde ve testisinde yapmış olduğumuz çalışmalarda iyonize radyasyonun ve melatoninin etkileri araştırılmıştır¹⁶⁻¹⁹. Literatürde radyasyonun pineal bez üzerine ince yapı düzeyinde neden olabileceği zedelenme ya da pineal bezden üretilen melatonin miktarındaki değişimler kısmen araştırılmış olmakla birlikte^{15,20}, radyasyonun oluşturduğu zedelenmenin ve ekzojen uygulanan melatoninin bu zedelenme üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalar henüz netlik kazanmamıştır. Ayrıca, sıçan pineal bezinin radyoterapiye verdiği yanıtın gün içinde nasıl değiştiği ve buna melatonin etkisi bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda tüm vücut radyasyon uygulaması yapılan deneklerde deneklerde, pineal bezde oluşabilecek histolojik değişimlere karşı, pineal bezin kendi salgısı olan, ancak araştırmamızda dışarıdan verilen melatoninin, olası koruyucu etkisi kronobiyojik olarak elektron mikroskop düzeyinde araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu deney Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Komitesi tarafından onaylandı. Deneyde ağırlıkları 250-300 g arasında değişen erkek Wistar albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Standart sıçan diyeti ile beslenerek suya serbest ulaşmaları sağlanmış, ışık, sıcaklık ve beslenme saatlerinin kontrol altında tutulduğu kafeslerde bakılmışlardır. Denekler, deneyin başlamasından iki hafta öncesinden itibaren sabah sekizden akşam sekize kadar aydınlıkta, geri kalan zaman diliminde ise karanlıkta bırakıldı. 48 denek, her bir grupta sekiz denek olacak şekilde (n=8) altı gruba ayrıldı (*Tablo 1*). G1 sabah kontrol grubu, G2 akşam kontrol grubu, G3 sabah TVR, G4 akşam TVR, G5 sabah TVR+melatonin, G6 akşam TVR+Melatonin gruplarıdır. Mevsimsel ritimin bulgularımızı etkilememesi için bütün deney protokolü kış mevsiminde iki ay içinde tamamlandı¹⁸.

İyonize Radyasyon Uygulaması

Radyasyon grubundaki deneklerin bir grubuna sabah 09.00'da, diğer grubuna akşam 21.00'de olacak şekilde ketamin anestezisi altında (100 mg/kg), 60Co kaynağı ile 8 Gy radyasyon deneklerin derilerinden 80 cm uzaklıktan, uygulandı⁶.

Melatonin Uygulaması

Melatonin (MLT) ya da çözücü (%20 etanol), radyasyon uygulamasından hemen önce, hemen sonra ve 24 saat sonra (melatonin dozu: 10, 20, and 10 mg/kg, ip) intraperitoneal olarak verildi. Radyasyondan 48 saat sonra tüm denekler xylazine HCl sedasyonunu izleyerek ketamine HCl ile anestezisi altına alınarak, %2.5'lik fosfat tamponlu gluteraldehit sol ventriküllerine enjekte edilmeye başlanıp tespit tüm vücut kasımları sona erdiğinde ve denekler katıldığında sonlandırıldı¹⁸.

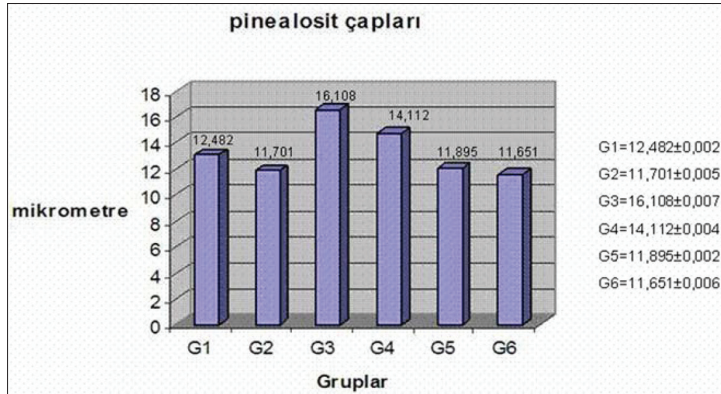
Elektron Mikroskopik İzleme Yöntemi

Tespit işlemi tamamlandıktan sonra deneklerin pineal bezleri çıkartılarak %2.5lik fosfat tamponlu gluteraldehit

(Sigma-Aldrich, USA) solüsyonunda ayrı şişelerde 2-3 saat bekletildi. Dokular fosfat tamponunda 2-3 kez yıkandıktan sonra 1/15 M fosfat tamponlu %1'lik osmium tetroxide (OsO_4) (Sigma-Aldrich) ile $+4^{\circ}C$ 'de ikinci tespitleri yapıldı. Bu aşamadan sonra tekrar fosfat tamponu ile yıkanarak, artan eter alkol serilerinden geçirilerek dokular sudan kurtarıldı. Son olarak propilen oksitten (Sigma-Aldrich) geçirilen dokular Araldite CY 212 (Ciba-Geigy, USA), (2-dodecen-1-yl) succinic anhydride (Sigma-Aldrich), benzyldimethyl amine (Poly-Sciences Inc., USA) ve dibutylphtalate (Sigma-Aldrich) karışımına gömüldüler. Polymerizasyon işlemi dokuların 24 saat $40^{\circ}C$ 'de ve 48 saat $60^{\circ}C$ 'de etüvde bırakılmasıyla tamamlandı. Yarı ince kesitler (Leica EM UC7 Ultramicrotom) toluidin mavisiyle boyanarak (Sigma-Aldrich) foto-ışık mikroskopta (Leica DM4000, Germany) değerlendirildi. İnce kesitler ise uranil asetat (ProSciTech, Australia) ve kurşun sitrat (Sigma-Aldrich) ile boyanarak Carl Zeiss EVO LS 10 elektron mikroskopunda incelenerek değerlendirildiler ⁶.

İstatistiksel Analiz

Pinealosit mitokondriyon çapları ölçülürken, her gruptan 8 ayrı pinealositte, 1 merkez 5 perifer alanda aynı büyültmede (10.09 KX), rasgele seçilen mitokondriyonlar kullanıldı (Şekil 1, Şekil 2). Ayrıca her gruptan 8 farklı pinealositin çapları ölçüldü. Ölçümler için Carl Zeiss EVO LS 10 elektron mikroskopunun programı kullanıldı. İstatistiksel analiz Steel ve arkadaşlarının çalışmasında belirtildiği gibi yapıldı ¹⁹. Gruplararası karşılaştırma yapılabilmesi için ANOVA, Mann Whitney U testi uygulandı.



Şekil 2. Pinealosit mitokondriyon çaplarının ölçümleri

Fig 2. Measurement of pinealocyte mitochondrion diameter

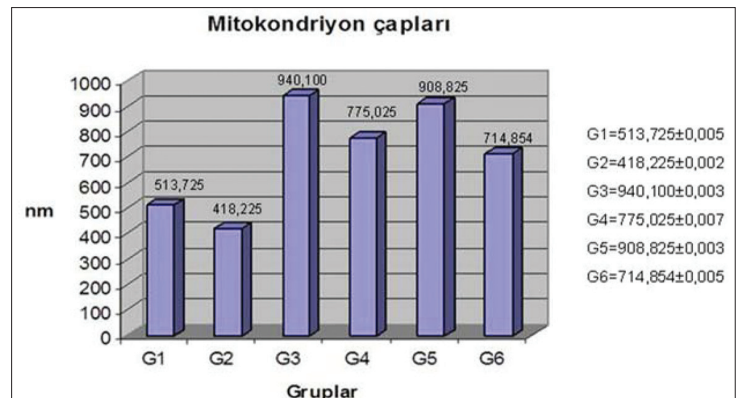
BULGULAR

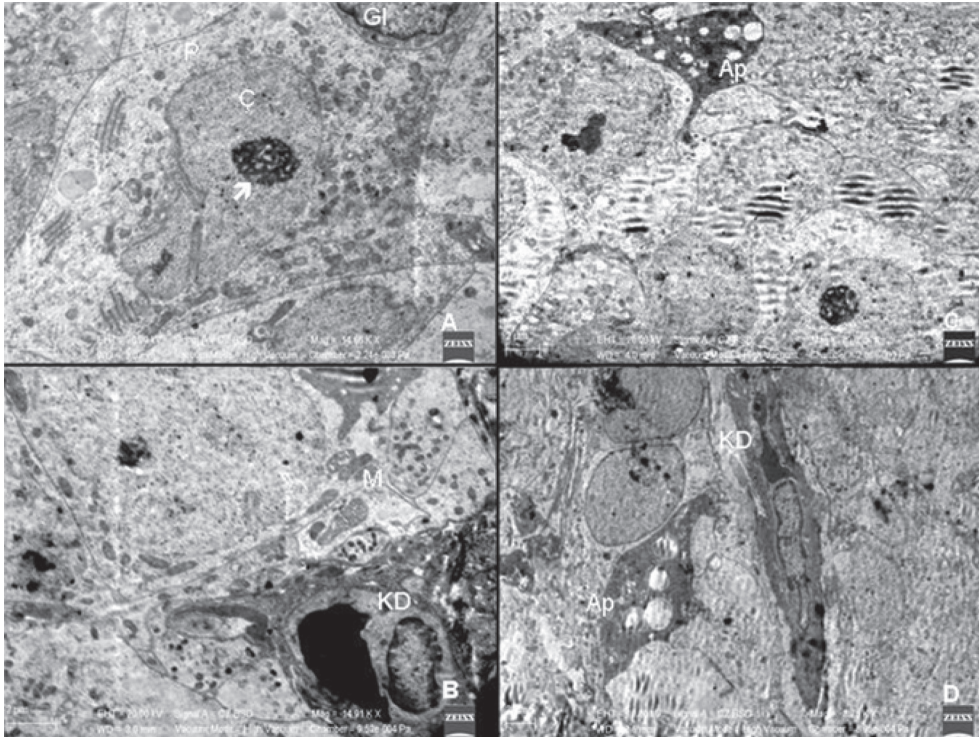
Kontrol grubunun, hem sabah (G1) (Şekil 3. A, B) hem de akşam (G2) (Şekil 3. C, D) olan alt grubunda pinealositler, glia hücreleri normal ince yapılarında izlendiler. Sabah ve akşam gruplarının arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($P>0.05$) (Tablo 1).

TVR uygulaması yapılan sabah grubunda (G3) (Şekil 4. A, B) pineal bezde, kontrol grubuna göre son derece önemli ve anlamlı dejeneratif değişimler izlendi ($P<0.05$). Pinealositler oldukça dilate görünümdeydi (Şekil 1). Yaygın nekroz görüntüsündeki pinealositler patlamış bir izlenim verirken mitokondriyon dışında diğer organeller net bir şekilde ayırt edilemiyordu. Mitokondriyonlar oldukça dilate ve kristolizis son derece belirgindi. Lipid damlalarında artma, damar duvarında belirgin ödem, çekirdek zarında balonlaşma (Resimde görülmüyor), pinealositlerde şişme saptandı. Bu grupta, akşam radyasyon uygulaması yapılan gruptan (G4) (Şekil 4. C, D) ayrıcalıklı olarak glia hücrelerinde de belirgin bir dejenerasyon izlendi. Tüm glia hücreleri hücresel bütünlüklerini kaybetmiş görünümdeydi. TVR akşam grubunda da (G4), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında oldukça ciddi dejeneratif değişimler görüldü ($P<0.05$). Sabah (G3) grubunda nekroz ön plandayken akşam grubunda (G4) son derece artmış apoptotik hücelere rastlandı. Ancak bu gruptaki pinealositler G3 grubundan daha az dilateydiler (Şekil 1). Damar duvarında ciddi ödem, pinealositlerin çekirdek zarı bütünlüğünde bozulma, lipid damlacıklarında kontrole göre azalma, çekirdekte bölünme ve dejenerasyon, ayrıca

Şekil 1. Pinealosit çap ölçümleri

Fig 1. Measurement of pinealocyte diameter





Şekil 3. Kontrole ait sabah (A, B) ve akşam (C, D) gruplarında pinealositler (P) ve glia (GL) hücreleri normal ince yapılarında izleniyorlar. Ç: Çekirdek, è: Çekirdekcik, î: GER, M: Mitochondriyon, L: Lizozom, KD: Kan damarı, Ap: Apoptotik cisim (Uranil asetat-Kurşun sitrat)

Fig 3. Normal pinealocytes (P) and glial (GL) cells observed in morning (A, B) and evening (C, D) control group. N: Nucleus, è: Nucleolus, î: GER, M: Mitochondria, L: Lysosome, BV: Blood vessel, Ap: Apoptotic body (Uranyl acetate-lead citrate)

Tablo 1. Çalışma gruplarının tedavi düzeniği

Table 1. Treatment composition of experimental groups

| Gruplar | Radyasyon | Çözücü | Melatonin Tedavisi |
|---------------------|-----------|--------|--------------------|
| G1 (Kontrol- Sabah) | - | - | - |
| G2 (Kontrol-Akşam) | - | - | - |
| G3 (TVR-Sabah) | + | + | - |
| G4 (TVR-Akşam) | + | + | - |
| G5 (TVR+MLT-Sabah) | + | + | + |
| G6 (TVR+MLT-Akşam) | + | + | + |

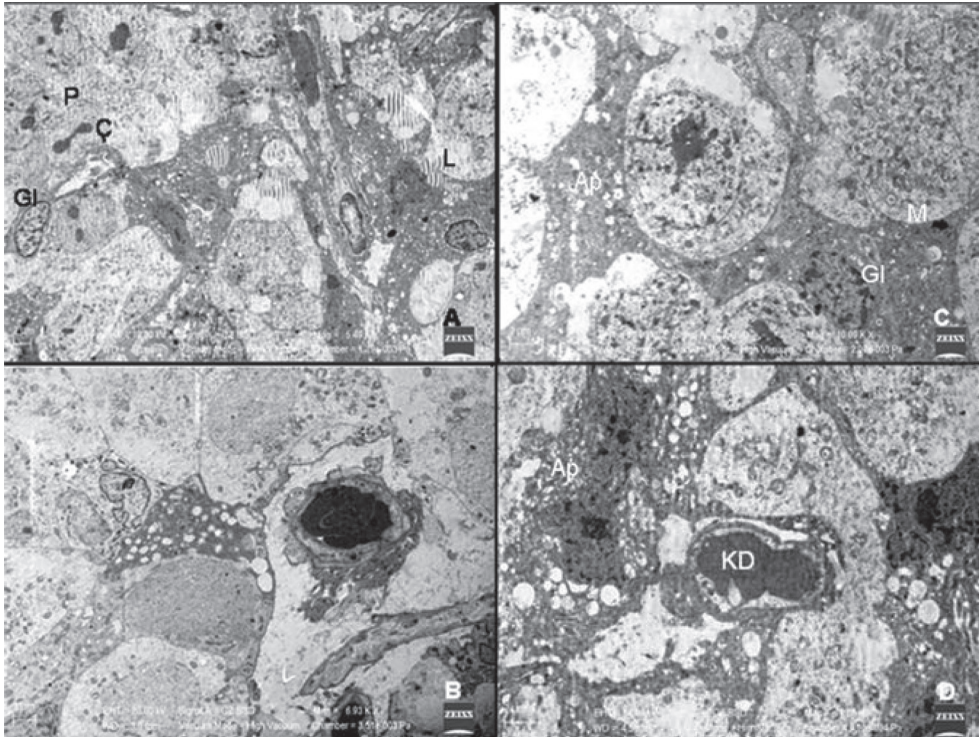
sitoplazmalarında osmiyofilik cisimcikler izlendi. Pinealosit sitoplazmasında çok sayıda dev vakuoller dikkat çekiciydi (Resimde gösterilmiyor). Mitochondriyal kristalizis belirgindi, ayrıca krista kaybı nedeniyle vakuolleşen mitokondriyonlarda granüler oluşumlar izlendi. Mitokondriyonların çapları yine kontrole karşı artmıştı (Şekil 2). Bu grubun hem sabah hem de akşam gruplarında GER tubulusları silinmiş gibiydi. Özellikle akşam grubunda GER tubuluslarının azalması melatonin sentezinde aksaklıkların olaylanabileceğini düşündürdü. İki radyasyon grubu karşılaştırıldığında ince yapı düzeyinde akşam grubunun uygulamadan daha fazla etkilendiği ancak pinealosit ve mitokondriyal dilatasyonunun sabah gruplarının-

Tablo 2. Gruplarda izlenen dejenerasyon kriterlerinin yoğunluğu

Table 2. The density of the degeneration criteria in experimental groups

| Dejenerasyon Kriterleri | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 |
|--------------------------------------|----|----|----|----|----|----|
| Lipid damlacıkları | 2 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2 |
| Vakuol | 0 | 0 | 2 | 3 | 2 | 2 |
| Kristalizis | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Apoptoz | 1 | 2 | 0 | 3 | 2 | 1 |
| Vasküler ödem | 0 | 0 | 3 | 3 | 2 | 2 |
| Miyelin figürler | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 |
| Çekirdek zarında balonlaşma/ayırışma | 0 | 0 | 3 | 3 | 0 | 1 |
| Çekirdekte bozulma | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 1 |
| Osmiyofilik cisimcik | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 |
| Lizozom | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| Nekroz | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 |

0: Dejeneratif değişim yok; 1: Az dejenerasyon; 2: Orta dereceli dejenerasyon, 3: Güçlü dejenerasyon

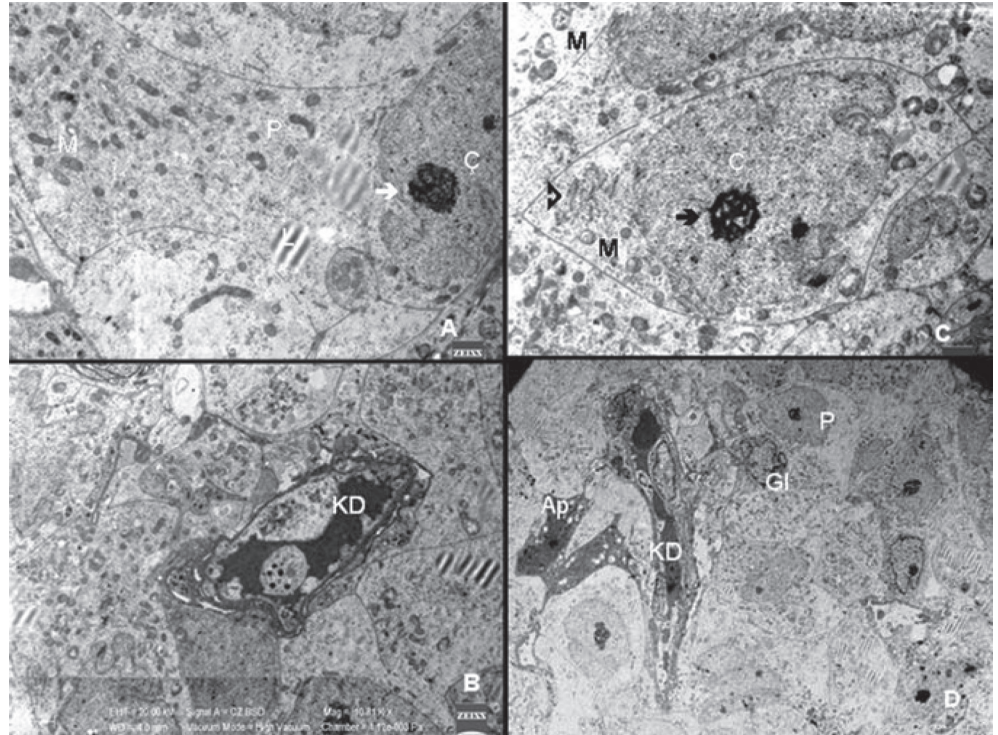


Şekil 4. TVR uygulamasına ait sabah (A, B) ve akşam (C, D) gruplarında pinealositler (P) ve glia (Gl) hücrelerinde belirgin dejenerasyon ayırt ediliyor. Ç: Çekirdek, M: Mitokondriyon, L: Lipid, KD: Kan damarı, Ap: Apoptotik cisim (Uranil asetat-Kurşun sitrat)

Fig 4. Distinct degeneration of the pinealocytes (P) and glial (Gl) cells were recognized in WBI morning (A, B) and evening (C, D) groups. N: Nucleus, M: Mitochondria, L: Lipid, BV: Blood vessel, Ap: Apoptotic body (Uranyl acetate-lead citrate)

Şekil 5. TVR+MLT uygulamasına ait sabah (A, B) ve akşam (C, D) gruplarında pinealositler (P) ve glia (Gl) hücrelerinde belirgin dejenerasyon ayırt ediliyor. Ç: Çekirdek, è: Çekirdekçik, M: Mitokondriyon, î: GER, L: Lizozom, KD: Kan damarı, Ap: Apoptotik cisim (Uranil asetat-Kurşun sitrat)

Fig 5. Distinct degeneration of the pinealocytes (P) and glial (Gl) cells were recognized in WBI+MLT morning (A, B) and evening (C, D) groups. N: Nucleus, N: Nucleolus, M: Mitochondria, î: GER, L: Lysosome, BV: Blood vessel, Ap: Apoptotic body (Uranyl acetate-lead citrate)



da daha fazla olduğu anlaşıldı. İstatistiksel açıdan fark anlamlı bulundu ($P<0.05$).

TVR ile birlikte MLT uygulaması yapılan sabah grubunda (G5) (Şekil 5. A, B), kan damarlarında minimal ödem, ender olarak apoptotik cisimcikler (Resimde izlenmiyor) izlenirken yapının kısmen normal ince yapısına döndüğü görüldü. Vakuoller azalmıştı, çekirdek zarı ve çekirdekçik normal ince yapındaydı, minimal ve granüler kristolizis izlenirken,

mitokondriyon çaplarının halen kontrole karşın son derece fazla olduğu izlendi. Mitokondriyal dilatasyondaki azalma oldukça azken melatonin uygulaması ile pinealosit çaplarının kontrole yakın bir değer kazandığı dikkati çekti (Şekil 2). Melatoninin akşam uygulandığı grup (G6) (Şekil 5. C, D), radyasyon akşam grubuyla (G4) karşılaştırıldığında birçok dejeneratif yapıda belirgin ve anlamlı düzelmeler saptandı ($P<0.05$). Ancak radyasyon uygulamasından en çok etkilenen grup akşam grubu olduğu için, G6 grubu G5 grubu

ile karşılaştırıldığında G5' in ince yapı düzeyinde kontrole daha yakın olduğu izlendi. Genelde iki melatonin grubu arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($P>0.05$). Minimal vasküler ödem, tek tük apoptotik cisimcikler izlenirken dev vakuollerin oldukça azaldığı dikkati çekti. Çekirdek ve çekirdekci yapıları normaldi ancak mitokondriyon çapları hala kontrole karşı oldukça yüksek ve mitokondriyal granüller hala belirgindi. Bununla birlikte pinealosit çapları radyasyon grubuna göre oldukça azalmış ve kontrol grubu ile eşdeğer duruma gelmişti (Şekil 2).

Genel olarak radyasyon uygulaması ile pineal bezin, özellikle pinealositler başta olmak üzere doku genelinde oldukça dejeneratif histolojik değişimler sergilediği görülmüştür. Radyasyon uygulamasının pinealosit ve mitokondriyon çaplarında belirgin dilatasyona neden olduğu ve melatonin uygulamasının pinealositlerin dilatasyonunu önleyebildiği, ancak mitokondriyal dilatasyon üzerinde kısmen etkili olduğu izlenmiştir. Bu durum melatoninin hücre zarı bütünlüğünün korunmasında daha etkin ancak mitokondri gibi organel membranlarının korunmasında ise daha az etkin olabileceğini düşündürmüştür. Belkide organel zarlarının korunabilmesi için daha uzun süreli melatonin uygulaması gerekmektedir. Melatonin uygulama sürelerinin arttırılacağı ek çalışmalara gereksinim olduğu kanısındayız. Ek olarak çalışmamızda tüm vücut radyasyon uygulamasından en çok akşam grubunun etkilendiği anlaşılmıştır. Melatonin uygulamasının ince yapı düzeyinde pineal bez üzerinde koruyucu etkisi olduğu görülmüştür.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Radyasyon uygulaması uzun yıllardır kanser tedavisinde önemli bir yer tutmaktadır. Radiosensitif tümörler üzerine olumlu etkilerinden dolayı yaygın kullanılıyor olmasına karşın sağlıklı hücreler üzerine olan olumsuz etkileri de bilinmektedir. Bu çalışmada sağlıklı sıçanlarda TVR uygulaması sonrası, endojen melatoninin üretiminden sorumlu yapı olan pineal bezde ve özellikle ince yapı düzeyinde mitokondriyonda oluşabilecek değişimler, radyasyon uygulaması öncesi ve sonrasında ekzojen verilen melatoninin etkisi elektron mikroskopik ve kronobiyolojik yöntemlerle araştırılmıştır. Melatoninin vücudumuzda günlük metabolik ritme koştur olarak oluşan serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak yolu ile güçlü bir antioksidan olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir²¹. Biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilecek kadar küçük moleküler ağırlıkta olması nedeniyle, hücrenin tüm organellerine kolaylıkla ulaşabilmekte ve DNA zedelenmesi de dahil olmak üzere hücre tarafından sentezlenmekte olan lipid ve proteinlerde oluşabilecek zedelenmeleri de kolaylıkla engelleyebilmektedir. Melatoninin radyoprotektif etkisi de gösterilmiştir²². Radyasyon uygulaması sonucunda ise tekli oksijen moleküllerinin ve serbest radikallerin oluşmasıyla apoptozis de dahil olmak üzere hücreyi ölüme götüren birçok zincirleme olayın geliştiği bildirilmiştir. Radyasyon uygulaması

sonucunda oluşan serbest radikallerden, kendisi de serbest radikaller üretmesine rağmen en çok mitokondriyonun etkilendiği söylenmektedir²³.

Çalışmamızın bazı parametrelerine benzer bir araştırma makalesinde, Popichiev ve ark.²⁰ γ -radyasyon ışınımının pineal bez üzerinde yapabileceği olası zedelenmeyi elektron mikroskopik olarak araştırmışlardır. Pinealosit, glia hücreleri ve bezin damarlarında son derece ciddi ince yapı zedelenmesi olduğunu belirten araştırmacılar, adrenokortikal işlevlerin inhibisyonunun da, γ -radyasyon ışınımının neden olduğu zedelenmeyi büyük ölçüde geri çevirebildiğini vurgulamışlardır²⁰. Bizim çalışmamızda da benzer olarak, pinealositlerde radyasyon uygulamasından sonra ince yapı düzeyinde önemli dejeneratif bulgular gözlemlenmiştir. Özellikle pinealosit ve mitokondriyon çaplarında belirgin artış, mitokondriyal kristolizis belirlenmiştir. Bu çalışmadan ayrıcalıklı olarak kronobiyolojik kurgulanan çalışmamızda, sabah uygulanan radyasyonun ardından glia hücrelerinde belirgin dejenerasyon olduğu saptanmıştır.

Kurgu olarak bizim çalışmamıza benzeyen Khavinson ve ark.'nın²⁴ yaptığı çalışmada, γ -ışınımına etkin kalan sıçanların pineal bezlerinde ince yapı düzeyinde oluşabilecek değişimler ve epithalonun'un olası koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada da bizim çalışmamıza benzer olarak, ince yapı düzeyinde pinealositlerde, glia hücrelerinde ve damar yapılarında belirgin dejeneratif değişimler saptanmıştır. Bizim çalışmamızda pineal bezin salgısı olan melatoninin koruyucu etkisi araştırılırken, bu çalışmada yine pineal bezde sentezlenen epithalamin'in korucu etkisi incelenmiş ve ince yapı düzeyinde epithalamin uygulanan grupta belirgin düzelmeler rapor edilmiştir²⁴. Bizim çalışmamızda bu çalışmadan ayrıcalıklı olarak mitokondriyon ve pinealosit çapları da ölçülmüş ve istatistiksel olarak gruplar arası farklılıklar değerlendirilmiştir (Şekil 1, Şekil 2).

Başka bir çalışmada tedavi amacı ile uygulanan UV-B ışınımının, U937 promonositik lösemi hücrelerinde neden olduğu apoptozis üzerinde melatoninin koruyucu olumlu etkileri gösterilmiştir. Bu çalışmada apoptozisin birkaç yoldan süreglebileceği ancak mitokondriyal yolağın son derece önemli olduğu vurgulanmıştır. Radyasyon uygulaması öncesinde verilen melatoninin ise apoptotik hücre sayısında önemli ölçüde düşüşe neden olduğu belirtilmiştir²³. Bizim çalışmamızda etkilerin gözlemlendiği yapı pineal bezin bütünüdür ve çalışmamızın amacı apoptozis de dahil olmak üzere bezin genelinde olaylanabilecek değişimlerin saptanmasıdır. Çalışmamızın sonunda, radyasyon uygulamasının ardından özellikle akşam grubunda sabah grubuna karşı anlamlı fark olacak şekilde, bezin genelinde apoptotik cisimciklerde önemli ölçüde artma ve melatonin uygulamasından sonra ise azalma gözlemledik.

Biyolojik işlevlerin, hücre içi organellerden organizmanın bütününe varıncaya dek, her seviyede, zamana bağlı değişiklikler gösterdiği bilinmektedir²⁴. Radyoterapinin yarattığı oksidatif stresin yol açtığı enzim aktivitesi ve

bunlara karşı savaş veren antioksidan sistemler de bu ritmik özelliğe sahiptirler²⁵. Bu durum, organizmanın zararlı uyarılara karşı, günün farklı zamanlarında, farklı durumlarda olması anlamına gelmektedir ki bu da uyarının etkisi ya da yan etkilerinde farklılıklar oluşturabilmektedir. Kronobiyojinin, bu konuyu araştıran alt bilim dalı kronotoksisine olarak adlandırılmaktadır. Radyoterapinin, sıçanlarda uygulanma zamanına bağlı olarak farklı etkiler oluşturabileceği daha önceki araştırmalarımız sonucunda sunulmuştur¹⁶⁻¹⁸. Literatürde de, 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde bırakılan fare ve sıçanlarda, tüm vücuda uygulanan iyonize radyasyonun kronobiyojik etkisi detaylı olarak derlenmiştir^{25,26}. Memelilerde hücre bölünmesi rastgele olmamakta, sirkadian bir ritim izlemektedir. Bu nedenle dokudan dokuya değişmekle birlikte hücrelerin, buldukları sıklusa göre belli sirkadian zamanlarda radiosensitif ve radiorezistan olduğu dönemler bulunmaktadır^{8,27-29}. Örneğin farelerde ve sıçanlarda, tüm vücut radyoterapisine bağlı mortalite ve toksik etkiler en çok akşam uygulamaları sonrasında meydana gelmektedir^{25-27,30}. Bu bulgular bizim çalışmamızın sonuçları ile paralellik göstermektedir. Kemirgenler bilindiği gibi, insanlardan farklı olarak biyolojik açıdan gece aktif olan canlılardır. Aktif oldukları bu dönemde, pineal bez radyoterapiye daha duyarlı gibi görünmektedir. Bunun bir nedeni, pineal bezdeki zedelenme sonucunda, karanlıkta salıverilen melatonin sekresyonundaki azalma; bir başka nedeni ise oksidatif stres yanıtının aktivite döneminde fazla olması olabilir. Bunları ancak hipotetik olarak söylememiz mümkündür çünkü çalışmamızın bir eksiği, melatonin düzeylerini ve oksidatif enzimleri ölçmemiş olmamızdır.

Sonuç olarak oluşturduğumuz bu deney modelinde, ekzojen uygulanan melatoninin sitotoksik olmayan, anti-apoptotik bir ajan olduğu ve radyasyon uygulamasının oluşturabileceği ince yapı düzeyindeki pineal bez zedelenmesi üzerine de koruyucu bir etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Bu koruyucu özellik hem sabah hem de akşam gruplarında ince yapı düzeyinde izlenebilmektedir. Melatoninin etkisi diurnal bir fark göstermemekle birlikte, akşam uygulanan iyonize radyasyon anlamlı olarak daha fazla zedelenmeye neden olmaktadır. Hücresel dejenerasyonun gösterilmesine yönelik yeni antikörler ile yapılacak immunohistokimyasal çalışmalar ile çalışmamız desteklenebilir.

KAYNAKLAR

- Beyer CE, Steketee JD, Saphier D:** Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery. *Biochem Pharmacol*, 56 (10): 1265-1272, 1998.
- Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuizen JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn HJ, Kalsbeek A:** Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci*, 11 (5): 1535-1544, 1999.
- Pevet P, Challet E:** Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clock network. *J Physiol Paris*, 105 (4-6): 170-182, 2011.
- Challet E:** Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals. *J Comp Physiol B*, 180 (5): 631-644, 2010.
- Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Van Der Vliet J, Pévet P, Buijs RM:** *In vivo* evidence for a controlled offset of melatonin synthesis at dawn by

thesuprachiasmatic nucleus in the rat. *Neuroscience*, 130 (3): 797-803, 2005.

- Mansour HH:** Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats. *Pharmacol Res*, 54 (3): 165-171, 2006.
- Sonmez OF, Odaci E, Bas O, Kaplan S:** Purkinje cell number decreases in the adult female rat cerebellum following exposure to 900 MHz electromagnetic field. *Brain Res*, 1356, 95-101, 2010.
- Çenesiz M, Atakişi O, Akar A, Önbilgin G, Ormanci N:** Effects of 900 and 1800 MHz electromagnetic field application on electrocardiogram, nitric oxide, total antioxidant capacity, total oxidant capacity, total protein, albumin and globulin levels in guinea pigs. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17 (3): 357-362, 2011.
- Carocho M, Ferreira IC:** A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*, 51, 15-25, 2012.
- Bharti VK, Srivastava RS, Subramanian P, Warren Spence D, Pandi-Perumal SR, Brown GM:** Cerebral epiphyseal proteins and melatonin modulate the hepatic and renal antioxidant defense of rats. *Int J Nephrol*, 2011:142896. Epub: May 26, 2011.
- Odaci E, Kaplan S:** Melatonin and nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol*, 87, 317-335, 2009.
- Turgut M, Uyanıkgil Y, Baka M, Tunç AT, Yavaşoğlu A, Yurtseven ME, Kaplan S:** Pinealectomy exaggerates and melatonin treatment suppresses neuroma formation of transected sciatic nerve in rats: gross morphological, histological and stereological analysis. *J Pineal Res*, 38 (4): 284-291, 2005.
- Brigaga MRPL, Barroso AS, Colepicolo P:** Fluctuation of reactive oxygen species released by inflammatory cells. In, Vanden Driessche T, Guisset J-L, Petiau-de Vries G (Eds): *The Redox State and Circadian Rhythms*. 1st ed., pp. 177-191, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2000.
- Hodoğlugil U, Ongun O, Güney Z, Altan N, Zengil H:** Temporal variation in hepatic superoxide dismutase activity in mice. *Chronobiol Int*, 12 (2): 152-155, 1995.
- Reiter RJ:** Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: A brief review. *Braz J Med Biol Res*, 26 (11): 1141-1155, 1993.
- Güney Y, Hicsonmez A, Uluoglu C, Güney HZ, Ozel Turkcu U, Take G, Yucel B, Caglar G, Bilgihan A, Erdogan D, Nalca Andrieu M, Kurtman C, Zengil H:** Melatonin prevents inflammation and oxidative stress caused by abdominopelvic and total body irradiation of rat small intestine. *Braz J Med Biol Res*, 40 (10): 1305-1314, 2007.
- Güney Y, Uluoglu C, Hicsonmez A, Ozel Turkcu U, Ozbey G, Bilgihan A, Nalca Andrieu M, Güney HZ, Zengil H:** Day and night effect of single dose of ionising radiation and melatonin treatment of lung tissue of rats. *Turk J Biochem*, 33 (3): 104-110, 2008.
- Take G, Erdogan D, Helvacioğlu F, Göktas G, Ozbey G, Uluoglu C, Yücel B, Güney Y, Hicsonmez A, Ozkan S:** Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes. *Braz J Med Biol Res*, 42 (7): 621-628, 2009.
- Steel RGD, Torrie JH, Dickey DA:** Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 3rd ed., New York: Mc Graw-Hill, New York, 1997.
- Popichiev VV, Yakovleva ND, Konoplyannikov AG, Kivetnoi IM, Kita K, Kita I:** Ultrastructure of pineal gland after γ -irradiation under conditions of inhibitions of adrenocortical function. *Bull Exp Biol Med*, 135, 706-710, 2002.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E:** Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: A review. *J Biomed Sci*, 7 (6): 444-458, 2000.
- Vijayalaxmi, Reiter RJ, Tan DX, Herman TS, Thomas CR:** Melatonin as a radioprotective agent: A review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 59 (3): 639-653, 2004.
- Luchetti F, Canonico B, Curci R, Battistelli M, Mannello F, Papa S, Tarzia G, Falcieri E:** Melatonin prevents apoptosis induced by UV-B treatment in U937 cell line. *J Pineal Res*, 40, 158-167, 2006.
- Khavinson VKH, Yakovleva ND, Popuchiev VV, Kvetnoi IM, Manokhina RP:** Reparative effect of epithalon on pineal gland ultrastructure in irradiated rats. *Bull Exp Biol Med*, 131, 98-103, 2001.
- Haus E, Touitou Y:** Principles of clinical chronobiology. In, Touitou Y,

Haus E (Eds): *Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. 2nd ed., pp. 6-34, Springer-Verlag, Berlin, 1994.

26. Haus E: Chronobiology of the mammalian response to ionizing radiation potential applications in oncology. *Chronobiol Int*, 19 (1): 77-100, 2002.

27. Scheving LE: Circadian rhythms in cell proliferation: their importance when investigating the basic mechanism of normal versus abnormal growth. *Prog Clin Biol Res*, 59, 39-79, 1981.

28. Haus E, Halberg F, Loken MK, Kim YS: Space radiation biology and

related topics. **In**, Tobias CS, Todd P (Eds): *Circadian Rhythmometry of Mammalian Radiosensitivity*. 1st ed., pp. 435-474, Academic Press, New York, 1974.

29. Pizzarello DJ, Usaak D, Chua KE, Rhyne AL: Circadian rhythmicity in the sensitivity of two strains of mice to whole-body radiation. *Science*, 17 (145): 286-291, 1964.

30. Erdogan A, İpekçioğlu E: Radyo frekans sinyalinin rat spinal ganglion hücrelerinde kalsiyum bağımlı klor kanallarına etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (5): 739-744, 2009.