

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
İZZET BAYSAL TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

İNTRA-PERİTONEAL MELATONİN
ENJEKSİYONU VE PİNEALEKTOMİ’NİN DENEYSEL
AKUT PANKREATİT MODELİNDE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. KAHRAMAN DİNLER

BOLU–2008

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
İZZET BAYSAL TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Hayri ERKOL
Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı

İNTRA-PERİTONEAL MELATONİN
ENJEKSİYONU VE PİNEALEKTOMİ’NİN DENEYSEL
AKUT PANKREATİT MODELİNDE ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. KAHRAMAN DİNLER

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Prof. Dr. Cavit ÇÖL

BOLU–2008

TEŞEKKÜR

Genel Cerrahi uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve tecrübeleriyle eğitimimde büyük katkı ve emekleri olan, her konuda destek ve yardımlarını gördüğüm başta sayın hocalarım, anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Hayri ERKOL ve tez danışmanım Prof. Dr. Cavit ÇÖL olmak üzere, özverileriyle bölüm hocalarımız Doç. Dr. Neriman ŞENGÜL, Yrd. Doç. Dr. Oğuz HASDEMİR ve Yrd. Doç. Dr. Nurettin KAHRAMANSOY'a,

Tezimin hazırlanmasındaki öneri ve katkılarıyla Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalından Prof. Dr. Aysel KÜKNER'e, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden Doç. Dr. Bülent GÜNDÜZ'e, Fakültemiz Biyokimya Anabilim dalından Yrd. Doç. Dr. Güler BUĞDAYCI'ya ve Halk Sağlığı Anabilim dalından Yrd. Doç. Dr. Aysu KIYAN'a,

Deney aşamasında beni yalnız bırakmayarak desteklerini esirgemeyen Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü öğrencilerinden sevgili Aliye KAYA ve Nilüfer ULAŞ'a,

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, bu süreçte yaşanan cerrahi zorlukları birlikte göğüslediğimiz asistan arkadaşlarıma, cerrahi eğitimim süresince göstermiş oldukları anlayış ve hoşgörülerinden dolayı poliklinik, ameliyathane ve servis hemşire ve personeline,

Tüm tıp eğitimim boyunca maddi ve manevi olarak desteklerini her zaman yanımda hissettiğim değerli aileme, sevgili eşim Nükhet DİNLER ve beni gece çalışmaya mahkum eden biricik oğlum Yağızhan DİNLER'e,

Sonsuz Teşekkürlerimi Sunarım.

Dr. Kahraman DİNLER, Bolu–2008

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. PANKREASIN EMBRİYOLOJİSİ	3
2.2. PANKREASIN ANATOMİSİ	3
2.2.1. Pankreasın Arterleri	4
2.2.2. Pankreasın Venleri	5
2.2.3. Pankreasın Lenfatik Drenajı	5
2.2.4. Pankreasın Sinirleri	5
2.2.5. Pankreatik Kanallar	6
2.3. SIÇANLARDA PANKREAS ANATOMİSİ	6
2.4. PANKREASIN FİZYOLOJİSİ	7
2.4.1. Ekzokrin Salgı Fonksiyonu	7
2.4.2. Endokrin Salgı Fonksiyonu	8
2.5. AKUT PANKREATİT	10
2.6. AKUT PANKREATİT VE OKSİDATİF STRES	15
2.7. AKUT PANKREATİT ve LİPİD PEROKSİDASYONU	18
2.8. APOPTOZİS	18
2.9. PİNEAL GLAND	20
2.9.1. Pineal Glandın Gelişimi	21
2.9.2. Pineal Gland Fizyolojisi	21
2.10. MELATONİN	23
2.10.1. Melatonin'in İmmün Sistem ve Oksidatif Stres üzerine Etkileri	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Cerrahi Teknik	29
3.2. Histopatolojik İnceleme	30
3.3. Biyokimyasal Ölçümler	31
3.4. İstatiksel Analiz	33
4. BULGULAR	34
4.1. Histopatolojik İnceleme Sonuçları	34
4.2. Biyokimyasal İnceleme Sonuçları	41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	47
6. KAYNAKLAR	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFMK: N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin

AFA: Arilamin formamidaz

AMK: N1-asetil-5-metoksikinüramine

ALT: Alanin aminotransferaz

AST: Aspartat aminotransferaz

BPK: Biliopankreatik kanal

c-AMP: Siklik adenin monofosfat

CAT: Katalaz

CCK: Kolesistokinin

DNA: Desoksiribonükleik asit

DIC: Dissemine intravasküler koagülasyon

ERCP: Endoskopik retrograde-kolangio-pankreatikografi

FADD: Fas adaptör protein

GCS: α -Glutamil cysteine sentetaz

GPx: Glutatyon peroksidaz

GRx: Glutatyon Redüktaz

GSC: Ganglion cervicale superior

GSH: Redükte glutatyon

GSSG: Oksidize glutatyon

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HE: Hemotoksilen-Eozin

HIOMT: Hidroksiindol-O-metil transferaz

LDH: Laktat dehidrogenaz

MDA: Malonildialdehit

MOF: Multiple organ yetmezliği

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NAT: N-asetil transferaz

NE: Norepinefrin

NF- κ B: Nükleer faktör kappa beta

NPV: Nucleus paraventricularis

NSC: Nucleus suprachiasmaticus

O₂⁻: Süper oksit anyonu

OH⁻: Hidroksil anyonu

PAF: Platelet aktive edici faktör

PMNL: Polimorfonükleer lökosit

PP: Pankreatik polipeptit

SPINK1: Serin proteaz inhibitör kazal tip 1

SOR: Serbest oksijen radikalleri

SOD: Süperoksit dismutaz

TBA: Tiobarbitürik asit

TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa

TNFR: Tümör nekroz faktör reseptör

TRADD: Tümör nekroz faktör reseptör adaptör protein

TRH: Tractus Retinohypothalamicus

VIP: Vasoaktif intestinal polipeptit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Sıra No		Sayfa No
Şekil 1:	Akut pankreatit fizyopatolojisi ve tripsinojen aktivasyon tablosu	14
Şekil 2:	Serbest oksijen radikallerinin üretiminde etkili enzim reaksiyonları	16
Şekil 3:	Pineal gland anatomisinin ve sinirsel innervasyonunun şematik görünümü	22
Şekil 4:	Pineal gland'da melatonin sentezinin kontrolü	24
Şekil 5A/B:	A) Deneklerde normal pankreas ve duktus yapısının makroskopik görünümü, B) Normal rat pankreas dokusunun ışık mikroskopik görünümü	36
Şekil 6:	Kontrol grubu ve tüm diğer deneklerde duktus ligasyonu sonrası koledokun dilate olduğu ve dokuda makroskopik ödem bulguları	36
Şekil 7:	Akut pankreatit geliştirilen deneklerde pankreasın mikroskopik görünümü	37
Şekil 8:	Akut pankreatitte lobüllerdeki asiner genişlemeler, duktal transformasyonlar ve lobüller arası hemorajik alanların görünümü	37
Şekil 9A/B/C:	A) Akut pankreatitte PMNL artışı, ödem, asinuslarda dejenerasyon, B) Ödeme bağlı Langerhans adacığının izolasyonu, C) Asinuslarda genişlemeler ve apoptotik cisimciklerin görünümü	38
Şekil 10A/B:	Grup II'deki deneklerde (melatonininden yoksunlaştırılmış grup) pankreas kesitlerinin görünümü	39
Şekil 11:	Pankreatit + Pinealektomi + Melatonin uygulanan grupta akut pankreatit sonrası pankreas kesitlerinin mikroskopik görünümü.	39
Şekil 12:	Ekzojen melatonin uygulanan gruplarda pankreas bağ dokusunda belirgin artışının görünümü.	40
Şekil 13A/B:	Grup IV ratlarda pankreatitteki belirgin gerilemenin görünümü	40
Şekil 14	Akut Pankreatitli Deneklerde MDA Düzeyleri	44
Şekil 15	Akut Pankreatitli Deneklerde GSH Düzeyleri	45
Şekil 16	Akut Pankreatitli Deneklerde SOD Düzeyleri	46

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sıra No	Sayfa No
Tablo 1:	Pankreas dokusunda gözlenen PMNL infiltrasyonu, ödem ve hemoraji skorlarının dağılımı	34
Tablo 2:	Akut pankreatit geliştirilen deneklerde pankreas asiner hücrelerindeki dejenerasyon skorları ve apoptozis oranlarının dağılımı	35
Tablo 3:	Akut pankreatitli deneklerde AST, ALT, Amilaz, LDH enzim düzeyleri	41
Tablo 4:	Deneysel obstruktif pankreatit modeli oluşturulan deneklerde serum bilirubin düzeylerinin gruplara göre dağılımı	43
Tablo 5:	Akut pankreatitli deneklerde MDA, GSH ve SOD düzeyleri	44

ÖZET

Kahraman Dinler.

İNTRAPERİTONEAL MELATONİN ENJEKSİYONU VE PİNEALEKTOMİ’NİN DENEYSEL AKUT PANKREATİT MODELİNDE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI.

TIPTA UZMANLIK TEZİ. BOLU. 2008

Akut pankreatit; acil cerrahi hastalıklar içerisinde yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden, pankreas dokusunun biliyer nedenlere ve diğer etkenlere bağlı olarak inflamasyon, enfeksiyon ve bir dizi fizyopatolojik olay sonucu hasara uğramasıyla karakterize, ciddi bir hastalıktır.

Akut pankreatitdeki karmaşık fizyopatolojik olayların seyrini, endokrinolojik, enzimatik, biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikleri ortaya koyabilmek için çok sayıda klinik ve deneysel araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucu hastalığın fizyopatolojisi ve kliniğinde etkin rol oynayan hücresel düzeydeki değişiklikler ve birçok reaksiyonun mekanizması büyük ölçüde açığa çıkmıştır. Ancak bu konuda bilinmeyen mekanizmaların çokluğu nedeniyle pankreas ve pankreatikobiliyer sistem fonksiyonları ve hastalıkları günümüzde yinede deneysel araştırmalara ve ileri tekniklerle incelenmeye açık bir alan olma özelliğini korumaktadır.

Bu çalışmada deneysel olarak obstruktif pankreatit modeli oluşturulan ratlarda, kandaki melatonin düzeyinin azaltılması veya arttırılmasının pankreas dokusunda gelişen fizyopatolojik olayların üzerine etkisi, histopatolojik ve biyokimyasal olarak hangi değişikliklere neden olduğunu ortaya koymayı amaçlanmıştır. Bu amaçla, akut pankreatit oluşturulmuş ratlarda pinealektomi ile endojen melatonin kaynağını ortadan kaldırarak ve ekzojen melatonin enjeksiyonu ile farklı kan melatonin düzeyleri oluşturuldu. Melatonin düzeyleri farklı olan akut pankreatitli deneklerde pankreas dokusunda polimorf nükleer lökosit infiltrasyonu, dokuda ödem, dokuda hemoraji, asiner hücrelerde dejenerasyon ve apoptozis gibi histopatolojik parametrelerdeki değişiklikler, biyokimyasal olarak serumda aspartat transaminaz (AST), alanin transferaz (ALT), amilaz, laktat dehidrogenaz (LDH) ve bilirubin değerleri ile dokuda malonildialdehid (MDA), glutatyon (GSH) ve superoksit dismutaz (SOD) düzeyleri incelendi. Bu parametreler yönünden gruplar

arasındaki farklı bulgular değerlendirilerek melatoninin akut pankreatitte etkileri yorumlandı.

Pinealektomili veya pinealektomisiz akut pankreatitli deneklerde 20 mg/ml melatonin solusyonundan 0,1 ml intraperitoneal enjeksiyonunun; pankreasta polimorf nükleer hücre infiltrasyonu, ödem, hemoraji ve asiner hücre nekrozunu, apoptotik hücre sayısını azalttığı, AST, Amilaz, LDH ve Bilirubin değerlerinde düşme sağladığı ve dokuda MDA düzeyini azalttığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada; ekzojen melatonin verilmesinin, akut pankreatitli deneklerde hastalığın fizyopatolojisinde önemli rol oynadığı bilinen lipid peroksidasyon ürünleri ve serbest oksijen radikallerinden MDA düzeyini azaltmak, AST, Amilaz, LDH ve Bilirubin düzeylerini düşürmek suretiyle oksidatif hasarı azaltarak dokuda inflamatuvar reaksiyonlarda kısmen iyileşmeye yardımcı olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akut Pankreatit, Melatonin, Deneysel Çalışma

ABSTRACT

Kahraman Dinler.

RESEARCHING THE EFFICENCY OF INTRAPERITONEALLY INJECTED MELATONIN AND PINEALECTOMY IN EXPERIMENTAL MODEL OF ACUTE PANCREATITIS.

MEDICAL SPECIALITY THESIS. BOLU. 2008.

The acute pancreatitis is a serious illness that progresses with high morbidity and mortality with damaging of pancreas tissue due to biliary causes as a result of inflammation, infection and serially physiopathological event, among emergency surgical diseases.

A lot of clinical and experimental researches are made to explain this complex physiopathological event and to introduce endocrinologic, enzymatic, biochemical and histopathological changes. In consequence of these studies, the changes in the cellular level that performs in the physiopathological and clinical lots of mechanism of reaction are explained. However, due to unknown mechanism about this subject, pancreas and pancreaticobiliary system functions and diseases, are still open to observation with experimental researches and progressed techniques.

In this study, we purposed to introduce decrease or increase in the level of melatonin in blood of experimental model of obstructive pancreatitis on rats, or the effects on the physiopathological events of pancreatitis which changes are caused histopathological and biochemical in pancreas tissue. With this purpose, the rats with acute pancreatitis whose blood melatonin level are different are occurred by applying pinealectomy in order to remove endogenous melatonin source or by using exogenous melatonin injection. Acute pancreatitis subjects (rats) whose melatonin levels are different, histopathological changes in white blood cell infiltration, edema and haemorrhage in tissue, degeneration of acinar cells and apoptosis are observed. Besides, biochemically aspartate transaminase (AST), alanin transferase (ALT), amylase, lactat dehydrogenase (LDH) and bilirubin values with malonyldialdehyde in tissue (MDA), glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) levels are observed. According to this parameters, differences between the groups are considered and its effects on melatonin acute pancreatitis are explicated.

In the subjects which have acute pancreatitis with pinealectomy or without pinealectomy who are intraperitoneally injected 0,1 ml melatonin (20 mg/ml), decreases in polymorph nuclear leukocytes infiltration, edema, haemorrhage and acinar cell necrosis, apoptotic cell number are observed. Besides, decrease in the values of AST, Amylase, LDH, Bilirubin and MDA level of tissue are determined.

As a result, in this study, it is concluded that exogenous melatonin injection on acute pancreatitis have an important role on lipid peroxidation products and free oxygen radicals causes inflammatory reaction in tissue and helps to healing by decreasing oxidative injuries and reducing levels of MDA, AST, Amylase, LDH and Bilirubin.

Keywords: Acute Pancreatitis, Melatonin, Experimental Study

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut pankreatit, pankreasta perivasküler infiltrasyon ve inflamasyonla birlikte yağ nekrozu, polimorf nükleer lökosit (PMNL) infiltrasyonu, hemoraji, asiner hücre nekrozu ve doku ödemi ile karakterize bir hastalık olup, tanı ve tedavisindeki güçlükler nedeniyle günümüzde Genel Cerrahi Kliniklerinin önemli hastalıklarından birisidir (1,2). Akut pankreatitler genellikle hafif ve kendini sınırlayan bir tablo şeklinde seyretmekle birlikte, zaman zaman karşımıza çıkan nekrotizan akut pankreatitler; modern yoğun bakım teknikleri, gelişmiş nutrisyonel destek uygulamaları, sıvı-elektrolit replasmanları ve mekanik ventilasyon olanaklarına rağmen %6,2-20,8 gibi yüksek mortalite hızlarıyla seyretmektedirler (1). Bu nedenle akut pankreatitlerin tanı ve tedavisiyle ilgili yapılan araştırmalar günümüzde de önemini korumakta ve bu konuda elde edilen gelişmeler klinik uygulamalara çok değerli katkılarda bulunmaktadır.

Akut pankreatitte lokal inflamasyonun şiddeti ve sistemik komplikasyonlar, sitokinlerin ve PMNL fonksiyonlarının up-regülasyonu, pankreastaki asiner hücre nekrozunun oranı ve bakteriyel kontaminasyonun gelişip gelişmediğiyle ilişkilidir (1,3). Akut pankreatit'in erken ve geç dönemlerinde aktif rol oynayan reaktif O₂ radikalleri lipid ve proteinlerin üzerinde direk etkiyle hücre membranı ve fonksiyonlarında bozulmaya, lizozomal enzimlerin serbestleşmesiyle pankreas hücrelerinde hasar yapmasına yol açar (3,4). Pankreas sekresyonlarının interstisyel alana ekstrasvazasyonu sonrasında proteolitik enzimler aktive olarak dokunun kendi kendini sindirme süreci başlatılmış olur. Dokuda ödem, mikrosirkülasyonda bozulma ve hücre düzeyinde iskemi gelişir. Bu da inflamasyonun derinleşmesine ve toksik mediyatörlerin dokuda birikmesine yol açar (5). Akut pankreatitin erken döneminde peripankreatik alana ve abdominal kaviteye sıvı sekestrasyonuna bağlı olarak hipovolemi; geç dönemde ise, barsaklardan bakteriyel translokasyona bağlı olarak gelişen septik komplikasyonlar ön plandadır. Daha sonra akciğer, böbrek ve karaciğerde fonksiyon bozuklukları, artmış metabolik aktivite ve bir dizi diğer fizyopatolojik olaylar sonucunda çoklu organ yetmezliği sendromu (MOF) gelişir (1,3,4).

Melatonin, immun sistem üzerine hücrel immunitiyi hem direk hem de indirek yollarla etkileyen bir hormondur. Pineal bezdeki pinealosit hücrelerinden ritmik olarak sentezlenen ve salınan melatonin, lipofilik ve hidrofilik özellikleri olması nedeniyle vücuttaki bütün morfofizyolojik bariyerleri geçerek her organdaki intersellüler alana ve hücre çekirdeğine kolayca ulaşabilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda melatonin'in serbest radikalleri tutucu etkisi ve yüksek antioksidan etkisi olduğu gösterilmiştir. Melatonin reseptörlerden bağımsız olarak toksik radikaller üzerine etki göstererek; yüksek toksik hidroksil, peroksil radikali, serbest O₂ radikali ve peroksinitrit anyonu gibi birçok serbest radikali parçalayabilmekte ve kuvvetli antioksidan etki göstermektedir. Buna ek olarak, melatonin'in genomdaki reseptörleri etkileyerek Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GPx) ve Glutasyon Redüktaz (GRx) gibi antioksidan enzim sistemlerini uyarıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir. Melatonin bu etkileriyle hücreleri oksidatif hasardan korumakta, dokuda inflamasyonu azaltmakta ve doku ödemi geriletmektedir (6). Bu nedenle pineal gland ve melatonin'in antioksidan etkisi ve immun fonksiyonlarla ilişkisi birçok araştırmanın konusu olmuştur.

Ancak melatonin'in akut pankreatit fizyopatolojisindeki olumlu ya da olumsuz etkisi literatürde pek az çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışmaların hiç birinde pinealektomi yapılmamış, yani vücut melatonin kaynağı ortadan kaldırılmamıştır. Literatürdeki bu grup çalışmalar vücuttaki normal melatonin sekresyonu devam ederken ekzojen melatonin verilmek suretiyle gerçekleştirilmiştir. Biz bu çalışmada, normal endojen melatonin salgısı devam eden ratlarla, pinealektomi yapılarak endojen melatonin salgısı ortadan kaldırılan, yani düşürülmüş melatonin plazma seviyesi olan ratlarda akut pankreatit modeli oluşturarak düşük melatonin düzeyinin, normal melatonin düzeyinin ve yüksek melatonin düzeyinin akut pankreatit fizyopatolojisi üzerine etkilerini gözlemlemeyi amaçladık. Bu amaca yönelik olarak, deneysel akut pankreatit gerçekleştirilen ratlarda melatonininden yoksunlaştırılmış düşük melatonin düzeyli grup, normal melatonin düzeyli grup ve yüksek melatonin düzeyli gruplardaki biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler saptanarak gruplar arasındaki farklı bulgular istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PANKREASIN EMBRİYOLOJİSİ

Pankreas intrauterin hayatın 4. ve 7. haftaları arasında primitif foregut endoderminden gelişen bir organdır. Pankreas duodenum kavsinden, dorsal ve ventral olmak üzere iki ana komponent şeklinde gelişmeye başlar. Dorsal tomurcuk, pankreas'ın gövde ve kuyruk kısmını oluştururken, ventral tomurcuk, pankreas başını ve ekstrahepatik safra yollarını oluşturur. Gestasyonun 7. haftasında ventral parça sağa rotasyon yaparak dorsal parça ile birleşir ve ana pankreatik kanal (ductus pancreaticus major veya diğer adıyla Wirsung kanalı) oluşur. Bu kanal koledok ile birleşerek ortak bir kanal halinde major papilladan duodenuma açılır. Her iki pankreas taslağının birleşmesinden sonra, dorsal pankreas kanalının duodenal parçası bazen körelir, bazen de aksesuar olarak kalabilir (ductus pankreatikus minor veya diğer adıyla Santorini kanalı). Dorsal pankreas'ı drene eden bu aksesuar kanal ana pankreatik kanalın ulaştığı Vater ampullasının 1-2 cm proksimalinde minor papillaya açılır. İnsanların % 5-10'unda ventral ve dorsal pankreatik taslaklar birleşemezler ve pankreasın büyük kısmının drenajı Santorini kanalı ve minör papilla orifisi yoluyla sağlanır.

2.2. PANKREASIN ANATOMİSİ

Pankreas retroperitoneal yerleşimli, yumuşak, sarı renkli lobüle bir organdır. Pankreasın gerçek fibröz bir kapsülü yoktur. Anatomik olarak baş, boyun, gövde ve kuyruk bölümlerinden oluşur. Erişkinlerde boyu 10-15 cm, ağırlığı 70-110 gr kadardır. Eni 3-5 cm olup en kalın yeri baş kısmında ve unsinat çıkıntısıdır. Gövde ve kuyruk daha incedir ve bunların eni 8-25 mm arasındadır.

Pankreas başı önde transvers kolon mezosu ile, arkada damarsız bir fasia ile sağ böbreğin damarları, vena kava inferior ve aortadan ayrılır. Baş bölümünden aşağı doğru uzanan bölüme unsinat proses denir ve bu parça sıklıkla süperior mezenterik venin önünde, %5 oranında da süperior mezenterik arterin arkasında yer alır. Pankreasın baş kısmı periton ve bağ dokusu ile duodenuma yapışır ve duodenumun ikinci parçasıyla birlikte ortak kan akımından yararlanır. Bu nedenle duodenektomi yapılmaksızın pankreası tam olarak çıkarmak imkansızdır. Sağda koledok kanalı bazen bir oluktan, bazen pankreas dokusu içinden geçer. Bunun solunda vena

portanın başlangıcı bulunur. Portal venden süperior mezenterik ven arasından geçen hayali çizgi ile pankreas baş kısmı boyun kısmından ayrılır ve bu kısım cerrahi anatomide büyük önem taşır. Gövde ve kuyruk kısmı ise, splenik vene paralel olarak dalak hilusuna kadar uzanır. Gövdenin üst kısmı splenik arter ve çöliak trunkus ile, alt kenarı duodenum'un 4. bölümü, Trietz ligamenti ve ilk jejunal anslarla komşudur. Gövdenin ön yüzü bursa omentalis'in arka duvarını yapan periton yaprağı ile örtülü olup, midenin antrumu, transvers kolon, karaciğer ve ince barsaklarla komşudur. Omentum minus gövdenin büyük bir kısmını ve kuyruğunu örter. Bunun sonucu olarak bu bezin boyun, gövde ve kuyruğunun tümör ve yaralanmaları gelişigüzel yapılan eksplorasyonlarda kolayca gözden kaçabilir. Pankreatik duktusun hasarı ve pankreas sıvısının sızması sonucu oluşan pankreas pseudokistleri tipik olarak önde mide, aşağıda transvers kolon, sol dış kısımda dalak hilusu ve sağda Winslow deliği ile sınırlanmış olup bursa omentalis minörde yerleşirler. Arka yüz peritonsuz olup sağdan sola olmak üzere aorta, superior mezenterik arter başlangıcı, sol renal arter, diaframanın sol krusu ve sol böbrek ile komşudur.

2.2.1 Pankreasın Arterleri

Pankreas, ana hepatik arter, splenik arter ve superior mezenterik arterler olmak üzere üç kökten kan alarak çok zengin bir kan akımına sahiptir. Ana hepatik arterin ilk büyük dalı olan gastroduodenal arter pankreas başını kanlandıran iki ana damardan biridir. Bu arter pankreas başının üst tarafından aşağı doğru uzanırken ikiye ayrılarak, superior pankreatikoduodenal arterin anterior ve posterior dallarını oluşturur ve superior mezenterik arterden çıkan inferior pankreatikoduodenal arterin anterior ve posterior dalları ile birleşerek pankreas başı ile duodenumun medial duvarı arasındaki oluktan aşağı doğru inerler. Ana safra kanalının distal parçası ile Vater ampullasının kanlanması büyük oranda posterior süperior pankreatikoduodenal arter ile sağlanmaktadır. Superior ve inferior duodenal arterler, pankreas dokusu içinde seyrederler ve total pankreatektomi sırasında tamamen kesilirler. Bu damarların kaybı ile belirgin duodenal dolaşım yetmezliği ortaya çıkar ve genellikle iskemik nekroz meydana gelir.

Boyun ve gövdenin kanlanması posterior pankreatik arter tarafından sağlanmakta olup, bu arter %40 oranda splenik arterden, %22 çöliak trunkus, %14 süperior mezenterik arter ve %12 ana hepatik arterden çıkmaktadır. Pankreasın üst

kenarından aşağı doğru uzanarak sola verdiği dallarla transvers pankreatik dalları oluşturup, sağa verdiği dallar ile süperior pankreatikoduodenal arkus ile birleşmektedir. Splenik arter dalak hilusuna gelene kadar pankreas parankimine 2 ila 10 arasında değişen sayıda küçük dallar verir.

2.2.2. Pankreasın Venleri

Pankreasın venöz drenajı, süperior mezenterik ven, inferior mezenterik ven ve splenik ven aracılığıyla olmaktadır. Posterior süperior pankreatikoduodenal ven portal venin sağ arka duvarına açılırken, anterior süperior pankreatikoduodenal ven ise gastrokolik trunkus ile süperior mezenterik vene açılmaktadır. Anterior ve posterior inferior pankreatikoduodenal ven dalları, ayrı ayrı veya birlikte süperior mezenterik vene açılmaktadır. Pankreas gövde ve kuyruk bölümünün venöz drenajı ise, transvers pankreatik ven ve splenik vene olmaktadır. Süperior mezenterik ven ile birleşene kadar olan bölümde splenik vene pankreastan 3 ila 13 arasında değişen sayıda kısa dalcıklar açılmaktadır. Bu damarlar frajildir ve diseksiyon sırasında kolayca yırtılırlar. Bu nedenle pankreasın gövde ve kuyruk rezeksiyonu sıklıkla splenektomi ile birlikte yapılır.

2.2.3. Pankreasın Lenfatik Drenajı

Pankreasın lenfatik drenajı, parankim içinde interlobüler alandan başlayıp önce pankreas yüzeyine, daha sonra çöliak, suprapankreatik, subpilorik, hepatik, splenik, superior mezenterik ve aortik bölgesel lenf nodlarına olmaktadır. Pankreas kanserlerinin rezektabilitesinin ve tedavi edilebilirliğinin düşük olmasında, mezenterinin olmayışı ve karnın arka duvarına erken direkt invazyonun yanısıra pankreasın lenf nodlarının anatomisi de önemli rol oynamaktadır.

2.2.4. Pankreasın Sinirleri

Pankreas hem splanknik sinirler yoluyla sempatik innervasyona, hem de arka vagus'un çöliak dalı ile parasempatik innervasyona sahiptir ve daha çok vagal innervasyonla kontrol edilir. Her iki sistem sinirleri de çöliak plexus yoluyla pankreasa ulaşırlar. Efferent lifler çöliak plexus ile pankreasın interlobüler septumunda yerleşmiş ganglionlara ulaşır asinusları, adacıkları ve kanalları inerve ederler. Pankreasa gelen tüm salgı sinirlerinin (sempatik sinirlerden çıkanlar da dahil olmak üzere) kolinerjik olduğu gösterilmiştir. Bu durumda akut pankreatitin

vagolitik (antikolinerjik) ilaçlarla ve kronik pankreatit'in ise gastrojejunostomi ile kombine bilateral vagotomi ile tedavi edilmesinin yararlı olacağı düşünülmüştür. Vagus duyu lifleri içermez ve pankreastaki ağrı duyusu splanknik sinirlerle taşınır. Nadiren kullanılmakla birlikte splanknikektomi ve splanknik blokajlar, pankreas kanserlerinin ve kronik pankreatitin şiddetli karın ağrısını dindirmede önemli yer tutar. Sempatik lifler çöliak plexus yoluyla splanknik sinirlerden gelirler ve pankreasın damar yapılarını inerve ederler.

2.2.5. Pankreatik Kanallar

Pankreasın ana kanalı olan Wirsung kanalı, pankreasın kuyruk kısmından başlayıp, sağa doğru gövde boyun ve baş kısmını geçerek duodenal duvarda %90 oranında koledok ile birleşerek ortak bir kanal şeklinde duodenum ikinci kıtasının posteromedial tarafındaki papilla Vateri'ye ulaşır. Pankreatik kanal yaklaşık 15-20 cm uzunluğunda 3-4 mm çapındadır ve 10-15 kanalcık bu kanala açılır. Duktus Santorini olarak isimlendirilen aksesuar kanal ise, Vater ampullasının 1-2 cm proksimalinde minor papillaya açılır ve ana kanala göre daha kısadır. Pankreas başının dorsokaudal bölümü Wirsung ile, ventrokaudal bölümü ise Santorini kanalı ile drene olmaktadır ve %90 olguda her iki kanal arasında yer yer iştirakler vardır.

2.3. SIÇANLARDA PANKREAS ANATOMİSİ

Siçanlarda pankreas, insanlardakinin aksine intraperitoneal yerleşimlidir ve gevşek bir yapıya sahiptir. Siçanda pankreas; dalak ile midenin büyük kurvaturunun alt bölümünde, duodenum kavsi ve ileum'un üst kısmı arasında mezenter içerisinde yayılmış loblar halinde yer alır. İki daldan oluşmuştur; sol dal (baş kısmı) duodenum kavsi içinde yer alırken, sağ dal (splenik kısım) midenin büyük kurvaturunun alt kısmından dalak hilusuna kadar uzanır. Siçanda insanlardakine benzer şekilde ayrı bir safra kesesi yoktur (7).

Karaciğerin çeşitli loblarından gelen safra kanalları birleşerek duktus koledokus'u oluşturur. Bu ana safra kanalı (duktus koledokus) duodenum'a gelmeden önce bir süre pankreas içinde ilerler ve bu sırada pankreastan gelen ortalama 10-15 pankreatik kanal burada safra kanalına açılır. Böylece duktus koledokus ve pankreatik kanallar birleşik halde ve tek bir ortak kanal halinde

Biliopankreatik Kanal (BPK) adıyla duodenuma açılır. Bu kanal tam duodenum'a girdiği yerden bağlanırsa, pankreas sıvısı duodenum'a geçemez ve pankreas kanallarına safra reflüsü olur. Bu şekilde cerrahi pankreatit modeli oluşturulabilir veya karaciğer hilusuna klemp konularak transduodenal BPK kateterizasyonu ve buradan madde enjeksiyonu yapılarak kimyasal pankreatit modeli oluşturulabilir (8).

2.4. PANKREASIN FİZYOLOJİSİ

Pankreas ekzokrin ve endokrin sekresyon fonksiyonu olan bir organdır. Dış salgı asinus hücreleri, iç salgı ise Langerhans adacık hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Endokrin sekresyon (insülin ve glukagon) yaşamın sürdürülmesi için mutlak gereklidir. Ekzokrin sekresyon ise barsak lümenine sindirimi geniş ölçüde kolaylaştıran sodyum bikarbonat ve sindirim enzimlerinin salınımından sorumludur.

2.4.1. Ekzokrin Salgı Fonksiyonu

İnsan pankreasının günlük 1500-2500 ml berrak, kokusuz, ekstraselüler sıvı ile pH'ı 7.0-8.3 arasında değişen alkali yapıda ekzokrin salgısı vardır. Ekzokrin pankreas'ı oluşturan hücreler; asiner, sentrasiner ve duktal hücrelerdir. Pankreasın ekzokrin salgı yapan temel ünitesini Yunanca'da üzüm salkımı anlamına gelen asinuslar oluşturmaktadır. Bir asinus temel olarak protein sentezleyip salan asiner hücreler ve sıvı-elektrolit sekresyonunda rol alan duktal hücrelerden oluşmaktadır. Asiner hücreler yüksek oranda protein sentezleme yeteneğinde olup bu hücrelerin üzerinde, sekretin, VIP, kolesistokinin ve asetilkoline ait reseptörler gösterilmiştir. Zymoijen olarak inaktif bulunan 20 kadar enzim, asiner hücrelerin granüllerinden ekzositoz yardımıyla salınır. Bu salgının hızı, sekretin stimülasyonu ve normal bir yemeği takiben artış gösterir. Bu salgıdaki temel katyonlar Na^+ ve K^+ olup konsantrasyonları plazmadakine benzerdir. Başlıca anyonları klor ve bikarbonat olup bu iki anyonun toplamı sabittir (150 mEq/L). Akım hızı arttıkça bikarbonat konsantrasyonu artar, buna karşı klor konsantrasyonu azalır.

Ekzokrin pankreas salgısının kontrolünde hormonal ve sinirsel olmak üzere iki ana mekanizma söz konusudur. Hormonal kontrolün temel elemanları sekretin ve kolesistokinindir. Sekretin duodenumun asidifikasyonu sonucu ince barsaktaki yüzey epitel hücrelerinden salınmaktadır. Bikarbonat salınımını çok şiddetli, enzim salınımını ise daha zayıf bir biçimde uyarmaktadır. Böylelikle oluşan alkali

pankreatik sıvı, gastrik asiditeyi nötralize eder ve pankreas enzimlerinin aktivitesi için optimal pH'yı sağlar. İkinci temel eleman kolesistokinin (pankrezozimin), ince barsak kript hücrelerinin uzun zincirli yağ asitleri, esansiyel aminoasit ve gastrik asitin uyarısıyla enzimden zengin sekresyon sağlar. Bu iki temel hormonun dışında gastrin, pankreatik polipeptid, glukagon gibi diğer hormonlar da ekzokrin pankreas salgısına etkili iseler de bu etkileri oldukça azdır. Ekzokrin pankreas salgısının kontrolünde ikinci ana mekanizma sinirsel kontrol olup, N. Vagus'un uyarılması sonucu asetilkolinin asiner hücrelere direkt etki eder ve hormonal uyarı ile dolaylı olarak mideden asid salınımı artırır. Trunkal vagotominin pankreas salgısını azalttığı, proksimal gastrik vagotominin ise pankreas salgısı üzerine bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir.

Pankreatik enzimler 3 gruba ayrılır;

1. Amilolitik Enzimler: Amilaz, Hidrolaz
2. Lipolitik Enzimler: Lipaz, Kolipaz, Fosfolipaz A2
3. Proteolitik Enzimler: Tripsin, Kimotripsin, Karboksipeptidaz, Ribonükleaz, Deoksiribonükleaz, Elastaz

Amilaz, lipaz, ribonükleaz ve deoksiribonükleaz asiner hücrelerden aktif olarak salınırken, diğer enzimler inaktif prekürsörler olarak salınırlar. Duodenum'a sekrete edilen tripsinojen, duodenal enzim olan enterokinaz ile karşılaşınca tripsine dönüşerek aktive olur. Tripsin de diğer inaktif prekürsörleri aktif hale dönüştürür. Pankreastan salınan α -Amilaz enzimi; karbonhidratları oligo ve disakkaritlere, Lipaz ise yağları gliserol ve yağ asitlerine parçalar. Tripsin ve Kimotripsin proteinlerden değişik uzunlukta peptidlerin çıkmasını sağlar. Nükleazlar ise, ribonükleik ve deoksiribonükleik asitleri parçalar.

2.4.2. Endokrin Salgı Fonksiyonu

Endokrin pankreasın görevi insülin salgısı ile gıda maddelerinin depolanmasının kolaylaştırılması ve glukagon salınımı ile açlık dönemlerinde depolanan bu gıdaların mobilizasyonunun sağlanması olarak özetlenebilir. İnsülin ve glukagon ile pankreatik polipeptidler ve somatostatin Langerhans adacık hücreleri tarafından üretilirler. Langerhans adacıkları, %60-80'i Beta (insülin), %15-20'si Alfa (Glukagon), %5-10'u Delta (Somatostatin) ve % 15-20'si PP (Pankreatik Polipeptit) hücreleri olmak üzere pankreas'ın %1-2'sini oluşturur.

İnsülin: Proinsülininden pankreasın β (beta) hücrelerinde yapılır. Karbonhidrat, yağ, ve protein metabolizmaları üzerine önemli etkileri vardır. İnsülinin plazma yarı ömrü 6 dakika olup 10-15 dakikada dolaşımdan temizlenir. Yüksek karbonhidratlı bir yemeği takiben emilen glukoz hızla insülin salgını uyarır ve öncelikle karaciğer, kas ve yağ dokusu olmak üzere vücuttaki hemen tüm dokularda glukozun hızla tutulması, depolanması ve kullanılmasına yol açar. İnsülinin en önemli etkilerinden biri yemekten sonra emilen glukozun çoğunu karaciğerde glikojen olarak depolanmasını sağlamaktır. Açlıkta ise, kan şekeri düşerken, glikojen glukozu yıkılır, kana salınır ve kan şekerinin çok düşmesine engel olur. İnsülinin karaciğerdeki diğer etkileri arasında fazla karaciğer glukozunu daha sonra yağ dokusunda depolanan yağ asitlerine dönüştürmesi ve glukoneogenezi inhibe etmesi sayılabilir. İnsülin çeşitli etkileri ile adipoz dokuda yağ depolanmasına yol açar. Dokularda protein depolanmasını artırır ve protein yıkımını önler. İnsülin büyüme için growth hormon kadar gereklidir. Bu iki hormon büyümeyi sağlarken sinerjistik görev yaparlar.

Glukagon: Kan şekerinin düşmesiyle pankreasın Langerhans adacıklarının α (alfa) hücrelerinden salınan glukagonun glukoz metabolizması üzerine başlıca iki etkisi vardır; Glukagonun etkileri karaciğerde glikojenoliz ve glukoneogenezi uyarmaktır. Bir insana 4 saat boyunca glukagon infüze edilirse tüm karaciğer glikojenini tüketebilir. Glukagonun diğer etkilerinin hemen tümü, glukagon normal kan düzeylerinin üstüne çıkınca görülür. Bunlardan en önemlisi, adipoz doku lipazını aktive ederek yağ asitlerinin dolaşımdaki miktarını artırmaktır. Glukagon yüksek konsantrasyonlarda kalbin gücünü ve safra sekresyonunu artırır, gastrik asit sekresyonunu engeller. Yüksek konsantrasyonlardaki aminoasitler, özellikle alanin ve arjinin glukagon salgılanmasını artırır.

Somatostatin: Langerhans adacıklarının delta hücreleri dolaşımdaki yarı ömrü sadece 2 dakika olan somatostatini salgırlar. Oral ve intravenöz alınan besinler somatostatin salınımını uyarır. Somatostatinin çeşitli inhibitör etkileri vardır; İnsülin salınımını baskılaması ile birlikte, mide, duodenum ve safra kesesi motilitesini yavaşlatıp, gastrointestinal kanaldan sekresyon ve absorpsiyonu azaltmasına neden olur. Bütün bu etkilerin sonucunda barsaktan gıda emilimi uzar ve dokuların emilen gıdaları kullanmaları gecikerek, besin maddelerinin hızla tüketimi önlenir.

Pankreatik Polipeptit: Langerhans adacıklarının PP hücrelerinden, vagal kolinerjik uyarı ve hipoglisemi etkisiyle salgılanır. Kolesistokininin etkilerini inhibe ederek pankreasın ekzokrin salgısını azaltır. Bu hormonun klinik önemi, pankreatik endokrin tümörlerin tanısında ve tedaviye verdikleri cevabın izlenmesinde bir belirteç olarak kullanılabilmesidir.

2.5. AKUT PANKREATİT

Antik çağlardan beri bilinen ve önemini, 19. yüzyılın ortalarında pankreas'ın sindirim sistemi ile ilgili bir organ olduğu anlaşılmasından sonra kazanan bu hastalık için doğru olarak nitelendirilebilecek ilk tanımlama ve sınıflandırma, 1889 yılında Reginald Fitz tarafından yapılmıştır. 1890'da Langerhans; pankreas enzimlerinin dokulardaki yağları hidrolize ederek, gliserin ve yağ asitlerine ayırması sonucu, yağ asitlerinin de, kandaki kalsiyum ile birleşerek, erimeyen kalsiyum sabunlarını oluşturmalarının akut pankreatite neden olduğunu açıklamıştır (9). 1901'de Opie akut pankreatitten ölmüş bir hastanın otopsisinde Papilla Vateri'nin safra taşı ile tıkanmış olduğunu, safra kesesini sıkınca, safranın birleşik kanaldan pankreas içine girdiğini göstermiştir (9). Opie ve Halstedt buradan yola çıkarak halen tartışmalı olan, safra taşları ve pankreatit arasındaki ilişkiyi “ortak kanal teorisi” ile açıklamıştır. Ancak günümüzde safra taşının pankreatik inflamasyonu başlatma mekanizması tam olarak aydınlatılabilmiş değildir (4,9). 1925 yılında Moynihan, akut pankreatit'e bağlı morbidite ve mortalitenin önemini “batın içi organlara bağlı olarak gelişen felaketlerin en kötüsü akut pankreatittir” şeklinde ifade etmiştir (10).

1963 yılında Marsilya'da yapılan toplantıda pankreatitler; 1) akut, 2) nüks eden akut, 3) kronik, ve 4) nüks eden kronik pankreatit olmak üzere 4 grupta sınıflandırılmıştır. 1983 ve 1984 yıllarında Cambridge ve Marsilya'da yapılan toplantılarda önceki sınıflamalara göre basit bir sınıflama yapılarak pankreatit klinik, morfolojik, ve fonksiyonel değişikliklere göre akut ve kronik pankreatit olmak üzere 2 ana grupta toplanmıştır (9). Beger ve Buchler ise 1990'lı yıllara girerken “şiddetli” akut pankreatit için “pankreatik nekroz” kavramını yeni bir kriter olarak önermişlerdir. Tanımlamalar ve öneriler karmaşası ard arda gelince 1992 yılında yapılan Atlanta Konsensusu'nda akut pankreatit ve komplikasyonları için ortak bir sınıflama yapılmıştır (3,5,11). Buna göre;

Akut Pankreatitlerin Sınıflandırılması:

1. Hafif akut pankreatit (interstisyel ödematöz akut pankreatit)
2. Ciddi akut pankreatit (nekrotizan hemorajik akut pankreatit)
 - Steril Nekrotizan pankreatit
 - Enfekte Nekrotizan pankreatit

İnterstisyel ödematöz pankreatit, peripankreatik ödem ve yağ nekrozuyla kendini gösteren, nekroz bulunmayan pankreatit formudur. Nekrotizan pankreatit ise, yaygın pankreatik ve peripankreatik yağ nekrozu, parankimal nekroz ve hemoraji ile seyreden ciddi formdur (11). Peri pankreatik sıvı birikimleri veya pankreatit sonrası sıvı koleksiyonları ise “Postakut psödokist” veya “Pankreatik apse” şeklinde sınıflandırılmıştır (11).

Akut pankreatit, pankreasta perivasküler infiltrasyon ve inflamasyonla birlikte yağ nekrozu, hemoraji, asiner hücre nekrozu ve doku ödemi ile karakterize non-bakteriyel inflamatuvar bir hastalıktır (1,2). Akut pankreatitte temel fizyopatolojik olay, proteolitik ve lipolitik enzimlerin pankreas içinde aktivasyonu ile pankreasın kendi kendini sindirmesi ve buna bağlı gelişen inflamasyondur (12).

Akut pankreatit gelişiminde en sık belirlenen nedenler; safra taşları, alkolizm ve travmadır. Çoğu araştırmada safra yolu hastalıkları ve kronik alkolizm, akut pankreatit olgularının %75-90'ında etyolojiden sorumludur. Olguların küçük bir kısmında ise virütik hastalıklar, hiperkalsemi, hiperlipidemi ve genetik yatkınlık gibi faktörler rol oynamaktadır (12).

1. Safra Taşları: Akut pankreatitin en sık nedenidir. Safra taşları ile pankreas kanalının tıkanması, pankreas sekresyonuyla kanal içinde basınç artışı ve kanal hasarı, bunun sonucunda sıvının pankreas dokusuna geçerek enzim aktivasyonuna yol açar (13). İdiopatik akut pankreatit grubunda yine çapı 3 mm'den küçük safra taşları suçlanmaktadır (12).

2. Alkol: Pankreatik hipersekresyon, protein presipitasyonu, oddi sfinkter spazmı ve kalsiyum presipitasyonuna neden olarak pankreas kanalının basıncını ve duktal permeabiliteyi artırarak enzimlerin çevre dokuya sızmasına ve pankreatite neden olmaktadır. Gorelick, deneysel modellerde etanol'un asiner hücrelere direkt etki ederek kolesistokinin sentezini attırdığını göstermiştir (4).

3. Hiperkalsemi: Mekanizması net olarak bilinmemesine karşın, kalsiyum taşlarının pankreatik kanalı tıkanması pankreasa geçen enzimlerin aktive olmasıyla pankreatite yol açar (12).

4. Hiperlipidemi: En sık metabolik sebeptir. Şilomikronlar ve düşük dansiteli lipoproteinler akut pankreatite yol açabilir. Pankreatik kapiller dolaşımında yağ asitleri lipaz salgısını artırır, damar endotel hasarı sonucu eritrositlerin parçalanması staza, pankreatik iskemik hasara ve inflamasyona neden olur. Nadir görülmelerine rağmen özellikle çocuklarda lipoprotein metabolizma bozukluğu olan tip I, II ve V hiperlipidemilerde serum düzeyi 11 mmol/L'den yüksek trigliserit konsantrasyonlarında akut pankreatit gelişebilir (4).

5. Travma: Travmaya bağlı pankreatit nedenlerinden en önemlileri bilier, gastrik, kardiak veya splenik girişimler sırasında ortaya çıkan ve yüksek mortaliteyle seyreden travmatik akut pankreatitlerdir. ERCP ve endoskopik işlemler sonrası da %10 oranında akut pankreatit görülebilmektedir (14).

6. Heredite: Herediter pankreatitlerin otozomal dominant geçtiği bilinmektedir. Spesifik olarak Serin Proteaz Inhibitör Kazal Tip 1 (SPINK1) gibi tripsin inhibitör enzim eksikliğinde tripsin pankreatik kanalda aktive olarak tekrarlayan akut pankreatit ataklarına ve kronik pankreatite yol açmaktadır (4).

7. İlaçlar: Akut pankreatit nedenleri arasında nadir etyolojik faktörlerdendir ve %1,4-2 oranında saptanırlar. Steroidler, tiazid grubu diüretikler, tetrasiklin ve sülfonamid gibi antibiyotikler, azotipurin, 6-merkaptopurin ve östrojenler en sık pankreatite neden olan ilaçlardır. İlaçların bir kısmı hipersensitivite, bir kısmı da toksik metabolik etkilerine bağlı olarak pankreatit oluştururlar (4,14).

8. Enfeksiyonlar: En sık kabakulak ve Coxsackie B sorumlu tutulur.

9. Diğer: İskemi, pankreas divisium, duodenal tıkanıklıklar, intraduktal tümörler, otoimmünite ve idiyopatik nedenler şeklinde sıralanabilir (4).

Akut pankreatit patogenezinde çeşitli teoriler ortaya atılmıştır.

1. Obstrüksiyon-Sekresyon teorisi: Deneysel pankreatit modellerinde, pankreatik kanalın bağlanması insandakine benzer ödematöz pankreatit tablosu oluşturur. Pankreas salgısının uyarılması ile kısmi kanal tıkanıklığı yapıldığında daha şiddetli pankreatik inflamasyon olduğu gösterilmiştir. Bu teori bilier pankreatit etyopatolojisini açıklayabilir (9).

2. Ortak kanal teorisi: Opie'nin ortak kanal teorisine göre, ortak kanalın tıkanmasıyla pankreatik kanala safra reflüsü olması ve bunun sonucunda pankreatik kanalın geçirgenliği artar. Bu geçirgenlik artışı sonucunda pankreatik enzimlerin pankreas parankimine sızmasıyla pankreatit gelişecektir. Ortak kanalın 5 mm'den uzun olması pankreatit gelişme riskini arttırmaktadır (13).

3. Duodenal reflü teorisi: Duodenal içeriğin ampulla vateri'den pankreatik kanala reflüsü sonucu deneysel olarak hayvanlarda pankreatit oluşturulabilmektedir. İnsanda duodenum duvarı ve Oddi sfinkteri reflüyü önlediğinden bu mekanizmaya bağlı akut pankreatit gelişmesi mümkün görülmemektedir (13).

4. Pankreatik kanal geçirgenliğinin artması: Hayvan deneylerinde oral yolla aşırı miktarda etanol alınması, pankreas kanallarının dekonjuge safra tuzlarına maruz kalması, tıkanıklık sonucu kanal içinde pankreatik salgı artışı ve hiperkalseminin pankreatik kanal geçirgenliğini artırdığı, enzimlerin parankime sızarak pankreatite yol açtığı gösterilmiştir (9).

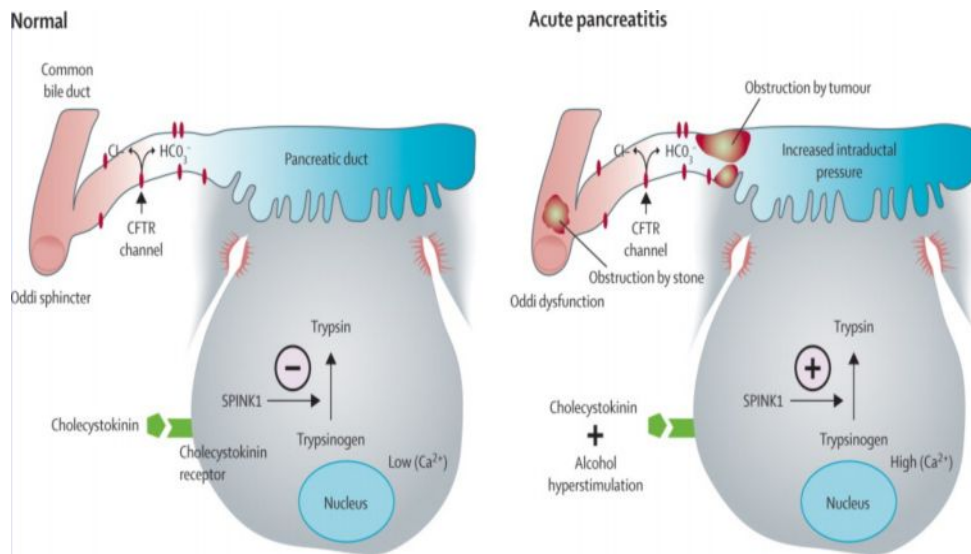
5. Enzim otoaktivasyonu: Deneysel hayvan modellerinde cerulein ile pankreas salgısının uyarılması enzim otoaktivasyonuna neden olurken, insanda bu etkiyle proteolitik enzim otoaktivasyonu tam olarak ortaya konulamamıştır (15).

6. Oddi sfinkter disfonksiyonu: Oddi sfinkterinde normal sfinkter basıncı yaklaşık olarak 15 mmHg (3-35 mmHg arası)'dır. Oddi sfinkterinde paradoksal kontraksiyonlar sonucu basal sfinkter basıncı 40 mmHg'nın üstüne çıktığında bilier veya pankreatik sıvı akışı durmakta ve bu durum akut pankreatit gelişimine neden olabilmektedir. Bu etyolojik olayın klinik tanısında sfinkter manometri ölçümü altın standarttır (16).

Akut pankreatitte olayları başlatan mekanizma ne olursa olsun, pankreas enzimlerinin dokuya sızması ve pankreastaki lokal etkiler sonucu sistemik bulguları ortaya çıkarmaktadır. Lokal inflamasyonun şiddeti ve sistemik komplikasyonlar, pankreas asiner hücre nekrozu ve bakteriel kontaminasyon gelişmesiyle ilişkilidir (1,3). Akut pankreatit'in erken ve geç dönemlerinde aktif rol oynayan reaktif O₂ radikalleri lipid ve proteinlerin üzerine direkt etki ile hücre membranı ve fonksiyonlarının bozulmasına, lizozomal enzimlerin serbestleşerek pankreas hücrelerinin hasarlanmasına neden olur (3,4). Pankreas sekresyonlarının interstisyel alana ekstrasvazasyonu sonrasında proteolitik enzimler aktive olarak dokunun kendi

kendini sindirme süreci başlar. Dokuda ödem ve beraberinde mikrosirkülasyonda bozulma ve hücre düzeyinde iskemi gelişir (5). Akut pankreatiti başlatan sebep ne olursa olsun, gelişen retroperitoneal hipovolemiden dolayı iskemi aynı zamanda pankreatiti ilerleten bir faktör olarak karşımıza çıkar (4,5). Pankreasda oluşan iskemi, reperfüzyon hasarına bağlı nekrozda etyopatogeneizde önemli rol oynamaktadır (15).

Pankreatitte oluşan inflamasyon, nekroz ve komplikasyonların patogeneğinde temel olay tripsinojenin tripsine dönüşerek aktive olmasıdır (Bkz. Şekil 1). Bu aktivasyon lizozomal enzimlerin (Katepsin B) etkisiyle veya tripsinojenin otoaktivasyonu ile olur (17). Tripsin ile aktifleşen zimojenler doku hasarına neden olurlar; Elastaz, kapiller duvar ve endotel hasarına yol açar, aktive olan kompleman sistemi ile lökosit kemotaksisine ve daha fazla inflamatuvar yanıtı, lipaz yağ nekrozuna, fosfolipaz A2 hücre membran hasarına, trombin DIC oluşumuna, PAF, Lökotrien, TNF- α ve serbest O₂ radikalleri kapiller permeabilite artışı ile MOF sendromuna uzanan sistemik inflamatuvar bir süreçte yol açar (5,15,17). Çalışmalar akut pankreatitin patogeneğinde serbest O₂ radikallerinin aşırı üretiminin ve sitokin değişimlerinin rolünün olduğunu göstermiştir. TNF- α , IL-1 veya IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin artması akut pankreatitte oluşan lokal doku hasarından ve multiple organ yetmezliğinden sorumlu tutulmaktadır (17). Serbest O₂ radikallerinin üretimi lipid membran peroksidasyonunu, sitoplazma ana öğelerinin değişimlerini, pankreastaki digestif enzimlerin vaktinden önce aktivasyonlarını ve akut pankreatitteki protein hasarını başlatır (5,15,17).



Şekil 1: Akut pankreatit fizyopatolojisi ve tripsinojen aktivasyon tablosu (4).

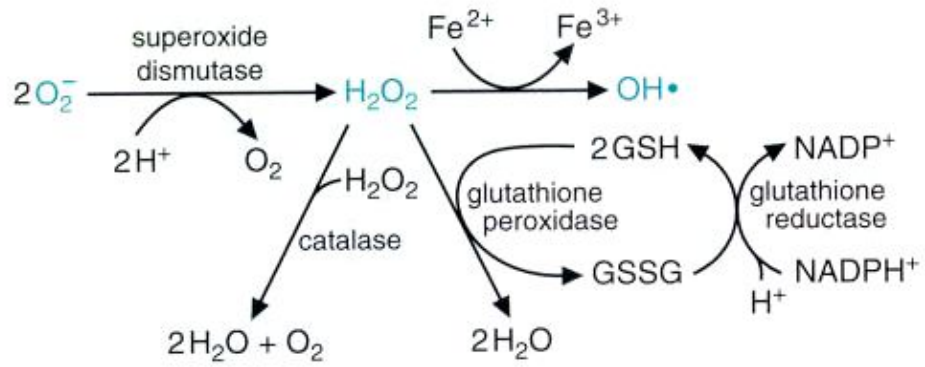
2.6. AKUT PANKREATİT VE OKSİDATİF STRES

Akut pankreatit, farklı derecelerde interstisyel ödem, asiner hücre hasarı, hemoraji ve hasarlı dokuya lökosit infiltrasyonu ile kendini gösterir (18). Serbest Oksijen Radikalleri (SOR), hastalığın patogenezi ve ilerlemesinde önemli rol oynarlar. Sanfey ve arkadaşları tarafından ilk kez akut pankreatitte SOR'nin rolünün gösterilmesinin ardından bu konuda çok sayıda deneysel ve klinik çalışma yapılmıştır (19). Farklı deneysel pankreatit modellerinde SOR'nin tetiklediği lipid peroksidasyonu ve glutatyon metabolizmasındaki değişikliklerin akut pankreatitin erken döneminde meydana geldiği gösterilmiştir (20). Lipid peroksidasyon ürünlerinde ikinci bir artış inflamatuvar hücrelerin hasarlı dokuyu transferinde görülür (21). Hastalığın ilerleyen evrelerinde lökosit aktivasyonu ve bunun sonucunda serbest radikal üretiminde artış ile birlikte pankreatik asiner hücre hasarı meydana gelmektedir. Hayvanlardaki pankreatit modellerinde de (cerulein, taurokolat veya alkole bağlı) oksidatif stresin rolü daha geniş olarak çalışılmıştır. Akut pankreatit gelişiminde SOR salınımı yalnızca pankreasta olmayıp bu SOR'in karaciğer ve böbrekte de meydana geldiği bildirilmiştir. Oksidatif stres, pankreatik inflamasyon gelişiminde ve ekstrapankreatik komplikasyonların oluşumunda önemli bir faktördür. Deneysel akut pankreatit modellerinin çoğunda, oksidatif stresin hastalığın başlangıç döneminde meydana geldiği gösterilmiştir (22).

Biyolojik sistemlerde kullanılan oksijenin %95'i mitokondri iç membranında bulunan sitokrom oksidaz enzimi tarafından kontrollü bir şekilde suya indirgenmektedir (23). Geri kalan %5'lik oksijende bu indirgenmenin tam olarak yapılamaması kısmi olarak indirgenmiş SOR'nin ortaya çıkmasına neden olur. Serbest radikal terimi ile eksternal orbitalinde eşleşmemiş elektron bulunduran moleküller kastedilmektedir. Kimyasal açıdan kararsız olan bu moleküller ya başka moleküllerle kimyasal bağ oluşturarak ya da onlardan elektron kopararak sabit hale dönüşürler (23). Süperoksit (O_2^-), hidrojenperoksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH^-) radikalleri biyolojik sistemlerde en çok oluşan SOR'dir. Bunlar içinde en toksik olanı (OH^-) hidroksil radikalidir. Hidrojenperoksit kimyasal açıdan bir radikal olmamakla birlikte hücre membranından kolay geçebilmesi ve hücre dışında fenton tepkimesi ile hidroksil radikaline dönüşmesi nedeniyle SOR olarak kabul edilir (24). Fizyolojik şartlar altında oluşan SOR, mikrovasküler tonusun düzenlenmesi, sitokin sentezinin

arttırılması, apoptozisin indüklenmesi ve fagositlerin mikroorganizmaları öldürmesindeki etkileri fonksiyonlarından sadece bir kısmını oluşturmaktadır (23).

Hücre, SOR'nin toksik etkilerinden korunabilmek için, enzimatik ve nonenzimatik çeşitli antioksidan mekanizmalar geliştirmiştir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimatik, glutatyon, karoten, askorbik asit, α -tokoferol ve selenyum ise nonenzimatik antioksidan reaksiyonları oluşturan serbest oksijen radikalleridir (25). Hücrede SOR'nin başlıca kaynakları; sitokrom oksidaz, ksantin oksidaz, sitokrom p-450 oksidaz, prostoglandin sentetaz ve fagositlerin membranında bulunan NADPH oksidaz'dır (23). Bunlar içinde akut pankreatit patogeneğinde en çok sorumlu tutulan serbest oksijen radikali ksantin oksidaz ve NADPH oksidazdır (23).



Şekil 2: Serbest oksijen radikallerinin üretiminde etkili enzim reaksiyonları

SOD, süperoksit serbest radikalının (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. İnsanda süperoksit dismutazın iki izomer tipi bulunmaktadır. Cu-Zn SOD sitozolde bulunur, Cu ve Zn içerir, dimerik yapıdadır, siyanidle inhibe edilir. Mn SOD mitokondride bulunur, Mn içerir, tetramerik yapıdadır, siyanidle inhibe olmaz. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dır. SOD'ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının (O_2^-) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır (21, 23).

Redükte Glutatyon (GSH), karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen bir tripeptittir. GSH çok önemli bir antioksidandır, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur.

Proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve aminoasitlerin membranlardan transportunu da sağlar (23,24).

Glutasyon peroksidaz (GPx) sitozolde bulunur, 4 selenyum atomu içerir, tetramerik yapıdadır. GPx, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz adı verilen bir enzim monomerik yapıdadır ve esas olarak membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger. Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı korur. Diğer antioksidanlarla birlikte GPx, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler (23,24). Glutasyon peroksidaz, GPx vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü katalize eder (21).

SOR'nin hücrede oluşturduğu başlıca etkiler için; hücre iskeletini oluşturan proteinlerin oksitlenmesi, hücre içi vezikül trafiğinin bozulması, membran akışkanlığının ve geçirgenliğinin artması, DNA kırıklarının oluşması veya nükleer faktör $\kappa\beta$ 'nın aktive olması gerekir (15). Nükleer faktör $\kappa\beta$, bir transkripsiyon faktörü olup akut pankreatit'te görülen sistemik komplikasyonlardan sorumlu tutulmaktadır (17).

Oksidatif stresi tespit etme ve SOR artışını belirleme yöntemlerinden en önemlisi endojen antioksidan olan glutasyon ve malonildialdehid (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin plazma veya doku düzeylerindeki artışın tespit edilmesidir (26). Ana safra kanalı bağlanmış ratların hepatik mitokondrilerinde antioksidatif kapasite azalması ve artmış lipid peroksidasyon ürünleri bildirilmiştir (27). Buna ek olarak, NADPH ile indüklenen mikrozomal lipid peroksidasyonunun kolestatik ratların karaciğerinde anlamlı derecede inhibe olduğu görülmüştür (28). SOR'nin artması ve bu gibi toksik ürünlerin plazmada yükselmesi karaciğerde olduğu gibi pankreas, böbrek ve diğer ekstrahepatik dokularda da aynı etkiyi göstermektedir (29).

2.7. AKUT PANKREATİT ve LİPİD PEROKSİDASYONU

Akut pankreatit'te lipid peroksidasyonunun arttığı ve pankreatit şiddeti ile oksidatif stres arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (30). Deneysel pankreatit modellerinde lipid peroksidasyon ürünlerinin artması muhtemelen oksijen radikalleri jenerasyonunda artış sonucu oluşmaktadır. SOR her türlü inflamatuvar doku hasarlarında yardımcı rol oynamakta ve pankreatit modellerinde de dokuda lipid peroksidasyon ürünleri artmaktadır (20).

Oksidatif stres, SOR oluşumuyla sonuçlanmaktadır ve bu olay hücresel enerji homeostazını bozmaktadır (29). Ayrıca SOR'leri protein, DNA ve lipidler ile reaksiyona girme potansiyeline sahip olan dokulara toksik etkili ürünlerdir. Lipid peroksidasyon ürünleri mitokondriyal respiratuvar zincirde bozukluğa yol açıp daha fazla SOR oluşumuna yol açabilir (24). Lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve tiol redoks durumu oksidatif stresin önemli göstergeleridir. Özellikle SOR'lerine bağlı reaksiyonların kanıtı olarak MDA oluşumu lipid peroksidasyonuna eşlik eder (26). Konjuge dien, lipidperoksit ve MDA varlığı lipid peroksidasyonunun farklı fazlarının göstergesidir. Konjuge dienler ve lipid peroksitler ara ürün iken, MDA son üründür. Artmış MDA düzeyleri lipidlerde oksidatif hasarı gösterirken, protein karbonillerin artmış düzeyi ise oksidatif protein modifikasyonunun göstergesidir. Bu reaksiyonlar ayrıca oksidize proteinlerde karbonillerin oluşumundan da sorumludur (26). Doku homojenatlarında anlamlı olarak artmış MDA içeriğinin gösterilmesi ana safra kanalı bağlanmış ratlarda artmış lipid peroksidasyonunun göstergesidir (29).

MDA, polienik yağ asitlerinin peroksidatif dekompozisyon ürünüdür ve deney hayvanında doku düzeyi lipid peroksidasyonunun yaygınlığını gösterir. Lipid peroksidasyonu geleneksel olarak MDA ölçümü ile değerlendirilmektedir. Lipid peroksidasyonu sonucu membran lipidlerinin oksidatif hasarı akut pankreatitte membranların fonksiyonel bütünlüğünü bozar (24).

2.8. APOPTOZİS

Apoptozis, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (31). Fizyolojik olarak oluşan hücre ölümü uzun yıllardır bilinmesine rağmen "apoptosis" terimini ilk kez

1972 yılında Kerr ve arkadaşları tanımlamışlardır (31). Bu deyim Yunanca APO = ayrı, PTOSİS = düşmek kelimelerinden oluşmuştur (31,32).

Canlı organizmada hücreler apoptozis ve nekroz olmak üzere iki temel mekanizma ile ölürler. Apoptozis, yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Fizyolojik ve patolojik uyaranlar ile düzenlenir. Geri dönüşü yoktur ve olduğu bölgede diğer hücresel yapılara zarar vermez, herhangi bir inflamasyona neden olmaz. Nekroz ise hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışı çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen patolojik hücre ölümüdür. Nekroz, geriye dönüşümü olmayan bir olaydır ve ortaya çıktığı alanda inflamatuvar değişiklikler söz konusudur (31,32).

Apoptozis, hücre içinden ve dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden olaylar zinciri olarak seyreder ve sonunda hücrenin fagositozu ile sona erer. Bu aşamalar;

- 1) Apoptozis'in başlatılması
- 2) Hücre içi proteazların (Kaspazların) aktivasyonu
- 3) Hücrede çeşitli morfolojik ve biokimyasal değişikliklerin oluşması
- 4) Fagositoz

Apoptozda rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup Tümör Nekrozis Faktör Reseptör (TNFR) ailesidir. Bir sitokin olan TNF'nin TNF reseptörleri ile birleşmesi (örn: TNFR1) sonucunda reseptörlerin hücre içinde bulunan parçası TNFR adaptör protein (TRADD) ile etkileşir. TRADD daha sonra, hücre yüzey reseptörü olan Fas reseptörünün hücre içindeki parçası Fas adaptör protein (FADD) ile birleşerek Prokaspaz 8'i aktifleştirerek apoptoza neden olur (31).

İç ve dış sinyallerle DNA hasarı oluşarak, hücre içi Ca^{++} seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve hücre siklusundaki bozukluklar gelişerek hücre içinde bulunan bir grup proteaz aktive olur. Bu proteazlara Kaspaz ("Caspase" = Cysteine containing aspartate specific proteases) adı verilir. Kaspazlar başlatıcı ve sonlandırıcı kaspazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığı ile, iç sinyaller ise mitokondri aracılığı ile başlatıcı kaspazları aktive ederler, bunlarda zincirleme olarak diğer kaspazları aktive ederler (31).

DNA hasarlanması sonucunda çekirdek kromatini dağılır ve çekirdek zarı parçalanır. Stoplazmik proteinlerin yoğunlaşması ve hacmin azalmasına bağlı olarak hücrede büzülme ortaya çıkar. Hücre organellerinin çoğunluğu, özellikle mitokondriler sağlamdır. Endoplasmik retikulum genişler ve hücre zarı ile birleşerek yüzeyde kraterler oluşturur. Bu evrede hücre zarında büzüşmenin artması ve hücrenin parçalanması görülür. Parçalanmış zarla çevrili yuvarlak yapılara “apoptotik cisim” denir (33).

Apoptotik cisimcikler hızla makrofajlar tarafından fagosit edilirler. Fagosit edilmeyenler daha sonra şişer ve dejenere olurlar. Bu olay nekroz ile aynıdır ve “sekonder nekroz” olarak isimlendirilir. Apoptozis sırasında hücre içi makromoleküller hücre dışına çıkmadığından herhangi bir inflamatuvar cevaba neden olmaz ve komşu hücrelerde zarar oluşturmazlar, kalıcı skar dokusuna yol açmaz (33).

Pankreas, parotis ve böbrek gibi organlarda kanal obstrüksiyonuna bağlı gelişen atrofilerde apoptozis gözlenir. Pankreas’da artmış sitokinler, özellikle TNF- α apoptozisi arttırıcı etki gösterir. İzole asiner hücreler pankreatit sıvısında eşit konsantrasyonda TNF- α ile karşı karşıya bırakılırsa apoptozise uğrar. TNF- α reseptör eksikliği olan hayvanlarda akut pankreatit boyunca apoptozisin görülmediği saptanmıştır (34).

2.9. PİNEAL GLAND

Pineal kelimesi Latince’de çam ağacı kozalağı anlamına gelen “pinea” kelimesinden gelmektedir. Pineal gland ile ilgili bilgilere göre Galen; insan pineal glandını çam ağacının tepesine benzemesi nedeniyle “Conarium” sözcüğü ile adlandırmıştır. Bu isimlendirmeden hareketle sonraki dönemlerde pineal sinirleri tanımlamak için de “nervi conarii” sözcüğü kullanılmıştır.

Vesalius (1514-1564) pineal glandın topografik yapısını dikkatlice incelemiştir. Rene Descartes (1596-1650) pineal glandı “ruhun oturduğu yer” olarak tanımlayarak bellek işlevlerindeki önemini vurgulamıştır. İkinci dönemde; Kolliker, memelilerin pineal glandında sinir liflerinin varlığını gözlemlemiştir (1850). 1904 yılında Cajal, fare pineal glandında demet yapan sinir liflerini bulmuş ve sempatik orijinli olduğunu iddia etmiştir (35,36). Pineal gland konusundaki en önemli gelişme, Lerner ve arkadaşlarının 1958 yılında pineal ekstrelerde bulunan, amfibienlere verildiğinde deri renginin değişmesine neden olan potansiyel pineal hormonunu izole

etmeleri olmuştur. Lerner bu maddeyi Yunanca'da siyah anlamına gelen “melas” ve iş anlamına gelen “tosos” kelimelerini birleştirerek “melatonin” olarak isimlendirmiştir (37).

2.9.1. Pineal Glandın Gelişimi

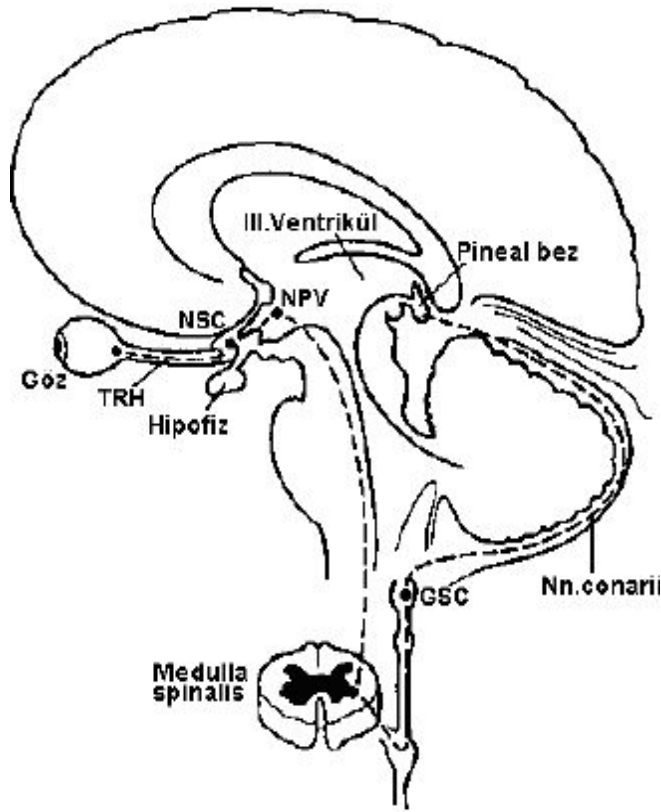
A. Prenatal dönem: İnsanda pineal gland, intrauterin hayatın 36. gününde, commissura posterior ve commissura habenulorum arasında, diencephalon'un üst arka bölümündeki nöroektoderm'den, nöroepitelium'un divertikülü şeklinde gelişmeye başlar. Nöroepithelial hücreler çoğalarak pinealoblastları, bunlarda parankima hücrelerine dönüşürler. Erken embriyonal dönemde commissuralardan gelen sinir lifleri organa ulaşır. Sempatik sinir lifleri ise yaklaşık 60. günde n. conarii yoluyla organın distal kutbundan girer ve innervasyonda başlıca rolü oynar (38). Kan damarları içeren stroma dokusu ise mezanşimden gelişir ve insan pineal bezi posterior serebral arterin medial posterior koroidal dalları ile beslenir. Bezin küçük çapına karşılık kanlanması oldukça güçlüdür ve organizmada böbrekten sonra en fazla kanlanan organdır. Pineal glandın venöz drenajı, Galen venine boşalan küçük pineal venler aracılığı ile olur (36,38).

B. Postnatal dönem: Pineal gland parankiminde pinealositler ve glia hücreleri olmak üzere iki tip hücre bulunmaktadır. Doğumda baskın olan hücreler glia hücreleri iken, postnatal yaşamın 3. ayından itibaren glia hücreleri azalır ve yerini pinealositler alır. Genel olarak pineal glandın 7 yaşına kadar büyüdüğü kabul edilmektedir (38). Erişkin insanlarda ortalama ağırlığı 100-180 mg olan pineal gland 5-9 mm uzunluğunda, 3-6 mm genişliğinde, 3-5 mm derinliğindedir. (36).

2.9.2. Pineal Gland Fizyolojisi

Pineal gland hipotalamus'ta yer alan nucleus suprachiasmaticus ile biyolojik bir saat gibi çalışır. Pineal gland sirkadiyan bir ritimle ve karanlıkta salgıladığı melatonin ile vücutta günün veya yılın farklı zamanlarına bağlı fizyolojik siklusların düzenlenmesinde görev alır (38). Melatonin pineal glandda belirgin gün içi ritimle sentez edilir. Sağlıklı bir rat'da 24 saat'de ortalama 10 µg melatonin salgılanmaktadır. Melatonin üretimi ve salınımı karanlık ile başlar, aydınlık ile sonlanır. Bu nedenle melatonin felsefi olarak "Karanlığın Kimyasal Anlatımı" veya "Endokrin Sistemin Drakulası" gibi isimlerle de anılmaktadır. Aydınlık dönemin

uzaması veya aniden ışığa çıkılması melatonin üretimini durdurur. Melatoninin salınımı geceleri büyük bir yükselme gösterir. Yükselmiş melatonin düzeyinin yüksek kalma süresi ise, karanlığın süresine bağlıdır. Kış aylarında, uzamış gecelerde, bu süre uzundur. Pinealektomi yapılması veya sempatik duyarsızlaştırma işlemi melatoninin gece yükselmesini önler (39). Melatoninin siklik salınımı daima hipotalamusta nucleus suprachiasmaticus'un sinirsel aktivasyonu sonucu oluşur. Ancak diyet, uyku süresi ve vücut postürüne göre melatonin sekresyonu bazı değişiklikler gösterebilir (29,39).



Şekil 3: Pineal gland anatomisinin ve sinirsel innervasyonunun şematik görünümü TRH: Tractus Retinohypothalamicus, NSC: Nucleus suprachiasmaticus, NPV: Nucleus paraventricularis, GSC: Ganglion cervicale superior(38).

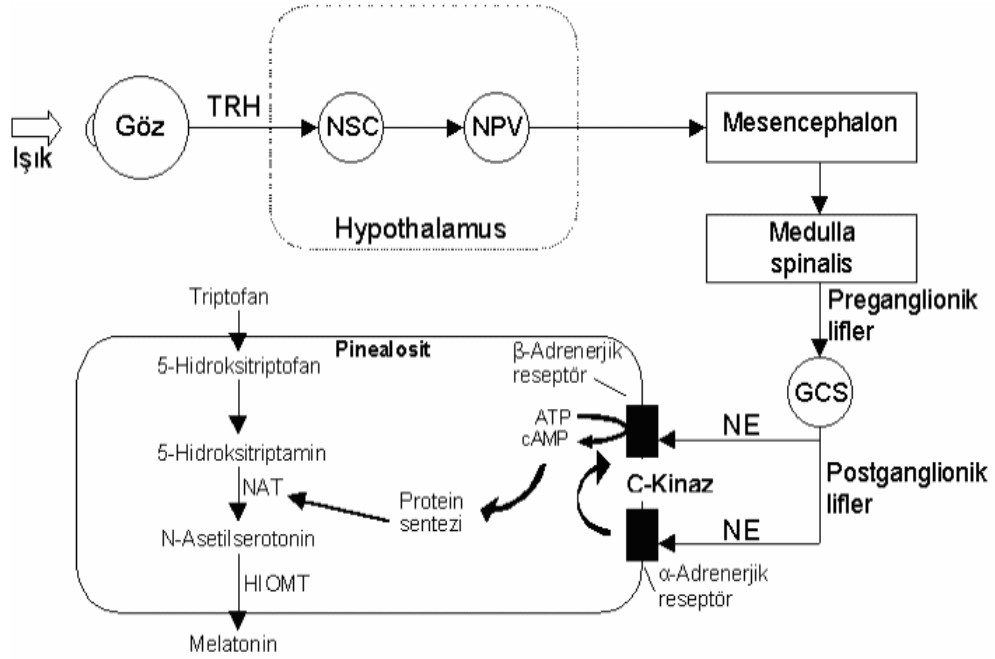
Pineal glandın salgı fonksiyonu indolaminler ve peptidler gibi iki grup endojen madde ile sağlanmaktadır. İndolaminler içinde en önemli endojen madde 232 moleküler ağırlıklı N-asetil-5-metoksitriptamin, yani melatonin'dir (36). Melatoninin pineal glanddan başka, retina, barsak gibi organlardan da sentezlendiği gösterilmesine rağmen, bunun kan melatonin düzeyine etkisi yok denecek kadar

azdır (39). Pineal gland içerisinde sempatik sinir uçlarındaki en önemli nörotransmitter noradrenalin'dir. Noradrenalin, postsinaptik reseptörler olan pinealosit membranındaki β ve α -reseptörlere bağlanır. Melatoninin %85'i β -reseptörlerin aktivasyonu ile, %15' i ise α -reseptörlerin aktivasyonu ile sentez edilir, β ve α -adrenerjik reseptörlerin uyarılması ile hücre içinde c-AMP ve N-asetiltransferaz (NAT) artışı olur. Melatoninin ön maddesi, bir aminoasit olan triptofandır ve bu madde pinealositler içinde önce serotonine, daha sonra melatonine dönüştürülür (39).

2.10. MELATONİN

Triptofan'ın aktif transportla pinealosit içine alınmasıyla başlayan melatonin sentezi, dört ardışık enzimatik reaksiyon sonucunda tamamlanır: İlk aşamada triptofan 5-hidroksilaz enzim etkisiyle 5-OH triptofan'a dönüşür. Daha sonra DOPA-dekarboksilaz enzimi etkisi ile dekarboksilasyona uğrar ve 5-OH triptamin (Serotonin)'e dönüşür. Son aşamada ise N-asetiltransferaz (NAT) ve Hidroksiindol-O-metil transferaz (HIOMT) enzimleri etkisiyle Serotoninden, Melatonin (5-metoksi-N-asetiltriptamin) oluşarak salgılanır (35,38,39).

Melatonin pineal glandda sentezlendikten sonra depolanmadan hızla dolaşıma verilir ve beyin omurilik sıvısı, tükürük, safra gibi vücut sıvılarına geçer. Bu sıvılarda serum düzeylerinden birkaç kat daha yüksek konsantrasyonda bulunur (40). Dolaşımdaki melatoninin, %50-75'i geri dönüşümlü olarak albümin veya alfa-asit glikoproteine bağlanarak dolaşır. Melatoninin yarı ömrü 30 ile 60 dakikadır. Dışarıdan verilen melatoninin yarılanma ömrü ise daha kısa olup 12 ile 48 dakika arasındadır. Dışarıdan verilen melatonin de endojen melatonin gibi aynı yolları kullanarak metabolize olur (35).



Şekil 4: Pineal gland’da melatonin sentezinin kontrolü. TRH: Tractus Retinohypothalamicus, NSC: Nucleus suprachiasmaticus, NPV: Nucleus paraventricularis, GSC: Ganglion cervicale superior, NE: Norepinefrin, NAT: 5-Hidroksitriptamin-Nasetiltransferaz, HIOMT: Hidroksiindol-O-metiltransferaz (35,38,39)

Raikhlin ve Kvetnoy tarafından yapılan çalışmalarda, gastrointestinal kanalda da melatonin bulunduğu, ilerleyen çalışmalarda gastrointestinal kanaldaki melatonin’in başlıca serotoninenden zengin enteroendokrin hücrelerde üretildiği ve serbest hormon olarak portal vende bulunduğu gösterilmiştir (41). Ayrıca, epifiz bezi kaynaklı melatonin de sindirim kanalı tarafından kullanılmaktadır. Bu nedenle gastrointestinal kanaldaki dokularda bulunan melatonin düzeyi plazmaya oranla oldukça yüksektir (41). Melatonin salınımı geceleri pineal glanddan olurken, gündüzleri sindirim kanalından özellikle gıda alımı sonrası gastrointestinal mukozada ve özellikle enteroendokrin hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda melatonin bulunur. Yapılan çalışmalar, portal ven ligasyonu uygulandıktan sonra triptofan alındığında plazma melatonin düzeyinde artma olduğu, Pinealektomi yapılan deneklerde ise portal vendeki melatonin seviyesinin etkilenmediğini göstermiştir (41).

Melatoninin inaktivasyonu, başlıca karaciğerde olmaktadır. Karaciğerde melatonin mikrozomal enzimler tarafından 6-hidroksimelatonin’e dönüştürülür. Bu madde sülfat yada daha az olarak glukuronik aside bağlanır. Melatoninin idrardaki

başlıca metaboliti olan 6-sülfatoksimelatonin, melatoninin sentez ve yıkımı için iyi bir göstergedir (38,39,41).

Melatoninin birçok major aktivitesi yüksek affiniteli MT1 ve MT2 gibi G proteine bağlı membran reseptörleri aracılığı ile olur. MT1 ve MT2, periferal organlar ve hücrelerde depolanır ve birçok vazomotor kontrolde rol oynar (42).

MT1 esas olarak, nöronal aktiviteyi düzenleme, arteriel vazokonstruksiyonu sağlama, kanser hücrelerinde proliferasyon, üreme ve metabolik fonksiyonların düzenlenmesine aracılık ederken; MT2 reseptör aktivasyonu, suprakiazmatik nükleus'un nöronal aktivasyonu ile sirkadiyan ritm'in düzenlenmesine, retina'da dopamin salınımının inhibisyonuna, arteriel yatakta vazodilatasyonun artışı ve lökosit göçünün inhibisyonu ve immun sistemin aktivasyonuna neden olur (43). Üçüncü tip ise MT3 olup, Quinon redüktaz 2 enzimi ile karakterizedir. Quinon redüktaz'ın, quinonların elektron transfer reaksiyonunu engelleyici ve oksidatif stresten koruyucu etkileri bulunur (44,45).

2.10.1. Melatonin'in İmmün Sistem ve Oksidatif Stres üzerine Etkileri

Pineal gland ile immün sistem arasında anatomik ve fizyolojik bir ilişki söz konusudur. Anatomik ilişki pineal gland ile timus'un süperior servikal gangliondan köken alan sempatik sinir lifleri aracılığı ile innerve edilmesidir. Pineal gland memelilerde, intrauterin yaşam ve yeni doğanlarda immün sistemin önemli bir parçasıdır. Timus'un gelişme sürecinde immün cevabın oluşturulması ve immün sistemin programlanmasında önemli rol oynar. Pineal glandın erken yaşlarda harap edilmesi humoral ve hücrel immün yanıtların gelişmesini durdurur (46).

Çok temel bir etki olarak, esansiyel aromatik aminoasit triptofan'dan türeyen indoller ve özellikle melatonin, elektron transferini düzenleyebilmekte, reaktif ara ürün radikallerini detoksifiye edebilmekte, peroksidatif reaksiyon zincirlerini güçlü bir şekilde kontrol edebilmektedir. Biyolojinin biyokimyasal işleyişinde oksidasyon ara ürünleri ve dolayısıyla oksidatif stres oluşumu kaçınılmazdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, oksidatif reaksiyonlara karşı vücutta oluşan endojen antioksidan maddelerden en güçlüsünün melatonin olduğunu göstermiştir (36).

Melatoninin bir antioksidan olduğu literatürde ilk kez 1991 yılında Ianas ve arkadaşları tarafından öne sürülmüş ve daha sonra yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarla bu hipotez desteklenmiştir. Melatoninin antioksidan etkileri genel

olarak incelendiğinde, adhezyon moleküllerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin sentezlerini azaltmayı da içeren oldukça geniş spektruma sahip bir antioksidan olduğu görülebilir (47).

Melatonin molekülü kolaylıkla oksitlenmez, otooksidasyona uğramaz ve redoks döngüsüne, hidroksil radikali üreten reaksiyonlara katılmaz. Melatoninin yanısıra melatonin metabolitlerinden hiçbirisinin prooksidatif aktivitesi yoktur. Melatoninin hidroksil radikali nötralize etme özelliği glutatyondan 5 kat, mannitolden 15 kat, peroksit radikal tutucu özelliği ise E vitamininden 2 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir (36). Daha da önemlisi, diğer antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve 5 yıl gibi uzun süre kullanımda bile, melatoninin toksik bir etki göstermemesidir (48).

Melatonin, immun sistem üzerine hücrel immunitiyi hem direkt hem de indirekt yollarla etkileyen bir hormondur. Melatonin, lipofilik ve hidrofilik özellikte olması nedeniyle bütün morfofizyolojik bariyerleri geçerek organizmada çok geniş bir alanda antioksidan etki gösterebilmektedir (6,43,49). Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen melatonin için bilinen hiçbir morfofizyolojik bariyerin olmaması, melatoninin tüm intrasellüler komponentlere rahatlıkla ulaşabilmesini sağlamaktadır. Böylece melatonin hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikallerin hasarından koruyabilmektedir (6,43). Hücre membranı ile temas ettiğinde, fosfolipid tabakanın dış yüzeyine tutunan melatonin, radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları detoksifiye eder ve membranı korur. Melatonin varlığında, mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan O_2^- , H_2O_2 ve OH^- gibi radikallerin üretimi de azalmaktadır (43,48,49).

Melatoninin antioksidan özelliği, yapısında bulunan pirol halkasından kaynaklanmaktadır. Fizyolojik şartlarda pek çok indol melatonine benzer şekilde yıkılırsa, O_2^- varlığında, melatoninin pirol halkasının indolamin 2,3-dioksijenaz ile enzimatik ya da hemin ile nonenzimatik olarak yıkımı, yüksek reaktiviteye sahip, N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin (AFMK) oluşumuyla sonuçlanmaktadır (43). Melatoninin H_2O_2 varlığında da AFMK oluşturduğu ve bu metabolitin radikal tutucu aktivite gösterdiği belirlenmiştir. AFMK, daha sonra arilamin formamidaz (AFA)'ın katalizlediği reaksiyonla N1-asetil-5-metoksikinüramine (AMK)

çevrilmektedir. Kinüramin türevi olan AFMK ve AMK gibi metabolitlerde, melatonin'in antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklerine sahiptir (43).

Çekirdeğe kadar ulaşabilme özelliği, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, melatonine bir üstünlük sağlamaktadır. Genomdaki reseptörleri etkileyerek Katalaz (CAT), Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GPx), Glutasyon Redüktaz (GRx) ve α -Glutamil Cysteine Sentetaz (GCS) gibi antioksidan enzim sistemlerinin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini arttıran uyarıcı etkisi vardır. Bu etkileriyle hücreyi oksidatif hasardan korur, inflamasyonu azaltır ve doku ödemi geriletir (6,43).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Yapılan deneysel çalışma, Abant İzzet Baysal Üniversitesi İzzet Baysal Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 26.09.2008 tarih ve 116 sayılı kararı ile onaylanmıştır. Bu çalışmada, toplam 40 adet Winstar Albino cinsi (200-250gr) erişkin erkek sıçan kullanılmıştır. Çalışmamızda her biri 10 sıçandan oluşan toplam 4 grup oluşturulmuştur. Tüm denekler 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda normal oda sıcaklığında (22°C) tutulmuş, standart palet sıçan yemi (210kcal/100gr/gün) ile beslenmiş ve musluk suyu içmişlerdir.

Çalışma iki ana grup rat modelinde planlanmıştır. İlk grup 10 rattan oluşturularak bu gruptaki ratlarda sadece deneysel akut pankreatit modeli gerçekleştirilmiş, başka herhangi bir cerrahi veya medikal girişim uygulanmayarak ek girişim uygulanacak olan diğer gruplardaki ratların kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Diğer çalışma grupları ise, üç farklı girişime tabi tutulacak şekilde alt gruplara ayrılmış ve faktöriyel model uygulanmak suretiyle elde edilen veriler, grupların kendi aralarında ve kontrol grubu ratların verileriyle karşılaştırılmıştır.

Grup 1 (Akut Pankreatit, n=10): Normal endojen melatoninli kontrol grubu. Bu gruptaki 10 sıçanda sadece obstruktif akut pankreatit modeli gerçekleştirilmiş, herhangi bir tedavi (melatonin injeksiyonu) veya başka bir cerrahi girişim (pinealektomi) yapılmamıştır. Bu grup denekler pinealektomi ve melatonin'in akut pankreatit modelinde etkinliğinin araştırılmasında kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir.

Grup 2 (Akut Pankreatit + Pinealektomi, n=10): Melatonin'den yoksunlaştırılmış grup. Bu gruptaki 10 sıçanda obstruktif akut pankreatit modeli gerçekleştirilmiş, ek olarak pinealektomi yapılmış ancak bu grupta da herhangi bir tedavi (melatonin injeksiyonu) yapılmamıştır.

Grup 3 (Akut Pankreatit + Pinealektomi + Melatonin, n=10): Ekzojen Melatonin grubu. Bu gruptaki 10 sıçanda obstruktif akut pankreatit modeli gerçekleştirilmiş, ek olarak pinealektomi yapılmış ve 2.gruba benzeyen bu grupta tedavi girişimi olarak 24 saat aralıklarla 7 gün boyunca intraperitoneal 0,1 ml melatonin solusyonu (20 mg/ml) injeksiyonları yapılmıştır.

Grup 4 (Akut Pankreatit + Melatonin, n=10): Yüksek melatonin grubu. Bu gruptaki 10 sıçanda obstruktif akut pankreatit modeli gerçekleştirilmiş, pinealektomi yapılmamıştır. 1.gruba benzeyen bu gruba tedavi girişimi olarak 24 saat aralıklarla 7 gün boyunca intraperitoneal 0,1 ml melatonin solusyonu (20 mg/ml) enjeksiyonları yapılmıştır.

3.1. Cerrahi Teknik

Deney hayvanlarına uygulanan bu cerrahi ve tıbbi girişimlerin tümü gruptaki her denek için aynı gün içinde, aynı cerrahi ekip tarafından, genel anestezi altında ve standart steril koşullarda gerçekleştirilmiştir. Tüm deneklerde enfeksiyon profilaksisi için antibiyotik olarak tek doz 2,5 mg/kg Enrofloksasin (Baytril % 10, Bayer-İstanbul) intramuskuler yapılmıştır. Genel anestezi için tüm deneklere 20 mg/kg dozda Ketamin HCl (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul) intramuskuler ve 5 mg/kg dozunda Xylazine HCl (Alphazin amp) intramuskuler uygulanmıştır.

Akut pankreatit modeli oluşturulurken cerrahi ligasyon tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla tüm deneklere orta hattan yapılan yaklaşık 2 cm'lik laparotomi yapıldıktan sonra non-travmatik eksplorasyonla pankreas bulunmuş, pankreatik kanal ortaya konulmuş ve 5/0 polipropilen suture ile kanal ligatüre edilerek obstruktif pankreatit oluşturulmuştur. Pankreatik kanal ligasyonu bitirildikten sonra, başka hiç bir abdominal girişim yapılmadan 3/0 polipropilen suture ile katlar anatomik planda kapatılmıştır.

Grup 2 ve Grup 3'deki deneklerde akut pankreatit modeliyle birlikte ve aynı seansta pinealektomi işlemi gerçekleştirilmiştir. Ratlarda Pinealektomi işlemi Hoffman ve Reiter metoduna göre yapılmıştır (50). Hemoraji kontrolünde aspirasyon-tampon yöntemi kullanıldı. Anestetize ratlar cerrahi sırasında kafaları stereotaksik aparata yerleştirilerek stabilize edildi. Kafaları %70'lik etanol ile silindikten sonra kas tabakası kafatasının dorsalinden kaldırıldı. Kafatası kuruduktan sonra dental drill ile inkomplet sirküler kesi ile kraniyotomi yapıldı ve pineal glandın üzerini örten kraniyum parçası anteriordan katlandı. Pineal gland ince uclu forceps ile tutuldu ve alındı. Pineal glandın alımından sonra kemik flep yerleştirildi ve pıhtılaşmayı desteklemeye yardımcı olması için, küçük kare şeklinde absorbabl jelatin spongostan (Gelfoam; Upjohn, Kalamazoo,) uygulandı. Skalp çelik cerrahi

stapler ile kapatıldı. Deney sonunda, pinealektomize hayvanlar dekapite edildi ve pinealektominin başarılı bir şekilde yapılmış olduğu konfirme edildi (50).

Grup 3 ve 4'deki deneklere akut pankreatit modeli gerçekleştirildikten 24 saat sonra 7 gün boyunca her gün akşam 18.00-20.00 saatleri arasında Melatonin (Simge, St.Louis, MO, USA) 20 mg/ml solusyonunda 0,1 ml intraperitoneal olarak verildi. Kullanılan bu doz yaklaşık 250 g ağırlığındaki bir Wistar Albino cinsi rat'ın pineal bezinden salınan bir gecelik dozu karşılayabilecek fizyolojik sınırlardaki dozdur. Deney süresi içinde Grup I ve III'de birer denek, Grup II'de 2 denek, grup IV'de ise 3 denek çeşitli teknik komplikasyonlar ve anestezi dozuna bağlı nedenlerle eksitus olduğu için çalışma dışı kalmıştır. Böylece I. Grupta 9, II. Grupta 8, III. Grupta 9 ve IV. Grupta 7 denek ile çalışma tamamlanmıştır.

3.2. Histopatolojik İnceleme

Cerrahi ligasyon yöntemi ile akut pankreatit modeli gerçekleştirildikten sonra 7.günde ratlar yeniden anestetize edilerek eski insizyon skarı üzerinden re-laparotomi yapılmıştır. Relaparotomi sonrası pankreas eksplere edilerek öncelikle dokudaki değişiklik makroskopik olarak gözlenmiş, daha sonra histopatolojik inceleme için doku örnekleri alınmıştır. Deneklerden alınan pankreas örneği %10'luk formaldehitde 48 saat tespit edilmiştir. Dokular dereceli etil alkol serilerinden geçirildikten sonra xylol ile şeffaflandırılmış ve parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanmış ve doku kesitleri ışık mikroskopunda incelenmiştir. Pankreatik dokuda PMNL infiltrasyonu ödem, hemoraji ve asiner hücre dejenerasyonu derecesi değerlendirilerek aşağıda belirtilen histolojik skorlamalar yapılmıştır (51).

Pankreasta **PMNL infiltrasyonu** için kullanılan skorlama yöntemine göre skorlama şu şekilde yapılmıştır.

Skor-0 = hiç lökosit infiltrasyonu yok,

Skor-1= perivasküler alanda hafif derecede lökosit infiltrasyonu var

Skor-2= perivasküler alanda orta derecede lökosit infiltrasyonu var,

Skor-3=tüm sahalarda şiddetli ve yaygın lökosit infiltrasyonu var

Pankreatik ödem için kullanılan skorlama yöntemine göre değerlendirme şu şekilde yapılmıştır:

Skor- 0 = pankreasta hiç ödem yok,

Skor-1 = interlobuler ödem mevcut,

Skor-2 = interlobuler ödem ve hafif intralobuler ödem mevcut

Skor-3 = interlobuler ödem ve şiddetli intralobuler ödem mevcut.

Pankreatik hemoraji için kullanılan skorlama yöntemine göre;

Skor-0 = pankreasta hiç hemoraji yok,

Skor-1 = pankreasta her kesitte 1-2 hemorajik alan mevcut,

Skor-2 = pankreasta her kesitte 3-5 hemorajik alan mevcut,

Skor-3 = pankreasta her kesitte 5'den fazla hemorajik alan var.

Pankreasta asiner hücre dejenerasyonu için kullanılan skorlama yöntemine göre;

Skor- 0 = pankreasta hiç asiner hücre dejenerasyonu yok,

Skor-1 = pankreasta her kesitte %15'den az hücrede asiner hücre dejenerasyonu

Skor-2 = pankreasta %15-35 oranda asiner hücre dejenerasyonu

Skor-3 = pankreasta %35'den fazla asiner hücre dejenerasyonu var.

Pankreasta asiner hücrelerdeki apoptozis değerlendirmesi için kullanılan skorlama yöntemine göre her bir deneğe ait doku kesitinde 10 alanda, X40 objektif büyütme ile apoptotik cisimcikleri belirgin olan hücreler sayıldı ve her alanda apoptozis görülen asiner hücreler yüzdelik dilimler halinde değerlendirildi. Elde edilen değerler istatistiksel olarak değerlendirildi ve gruplar arasında istatistiksel anlamlılık olup olmadığı araştırıldı.

3.3. Biyokimyasal Ölçümler

A) Rat Serumlarında Yapılan Ölçümler:

Çalışmanın 7.günü sonunda denekler sakrifiye edilmeden hemen önce deneklerden intrakardiyak olarak 2 cc kan alınmış ve AST, ALT, Amilaz, LDH, Total ve Direkt Bilirubin çalışılmıştır. Deneklerden elde edilen kan örnekleri antikoagülan içermeyen katkısız biyokimya tüplerine (Becton Dickinson, New Jersey, USA) alınmıştır. Yaklaşık 20 dakika dinlendirildikten sonra 3500Xg'de 15 dakika santrifüj edilerek ayrılan serumda 1/5 serum fizyolojik kullanılarak dilüsyon

yapıldıktan sonra Aspartat Transaminaz (AST), Alanin Transaminaz (ALT), Amilaz, Laktat Dehidrogenaz (LDH), Total ve Direkt Bilirubin Abbott Ticari kitleri kullanılarak otoanalizörde (Abbott Architect C8000, Chicago, IL, USA) çalışılmıştır. Sonuçlar enzimlerde aktivite, bilirubinlerde mg/dl olarak verilmiştir.

B) Biyokimyasal Doku Deneyleri:

Pankreatik doku çıkarıldıktan sonra soğuk serum fizyolojikle yıkanmış ve inceleme gününe kadar – 70 °C de derin dondurucuda saklanmıştır. Daha sonra 200 mg yaş doku ve 1.8 ml Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.4) içinde (1/9; ağırlık/volüm) + 4 °C’de teflon uçlu homojenizatör kullanılarak (IKA Ultra Turrax T 8, IKA Labortechnik, Staufen, Germany) 16 000 rpm’de 3 dakika homojenize edildi. Bu karışım 4000 g’de 20 dakika + 4 °C de santrifüj edilmiştir. Süpernatant ayrılarak doku proteini, MDA, GSH ve SOD deneyleri için kullanılmış, doku proteini Lowry metodu ile ölçülmüştür (52).

1. MDA Düzey Ölçümü:

Doku malonil dialdehid (MDA) tiobarbitürik asit (TBA) kaynatmalı metod kullanılarak ölçülmüştür. TBA, MDA ve MDA benzeri substratlarla reaksiyona girerek 532 nm’de pembe renk oluşturur. Triklorasetik asit (TCA) ile presipite edilen örneklerle TBA ve daha sonra n-butanol eklenerek 532 nm’de spektrofotometrik olarak (Digilab Hitachi U-2800, Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan) ölçülmüş, sonuçlar nmol MDA/mg yaş doku ağırlığı olarak verilmiştir (53).

2. GSH Düzey Ölçümü:

Redükte Glutasyon (GSH), Elman Reaktifi 5,5’- Dithiobis “2-nitrobenzoik asit”-DTNB; D8130, (Sigma-Aldrich- Sigma Chemical, St.Louis, Mo, USA) kullanılarak ölçülmüştür. Deneye başlarken Na₂HPO₄.2H₂O solüsyona süpernatant eklendikten sonra karışıma Elman reaktifi eklenmiş, karışım bekletilmeden 412 nm spektrofotometre’de (Digilab Hitachi U-2800, Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan) okutulmuştur. Sonuçlar nmol GSH/ mg yaş doku ağırlığı olarak verilmiştir (54).

3. SOD Aktivitesi Ölçümü:

Superoksid dismutaz (SOD) aktivitesinin, ksantin oksidaz ve hipoksantin oluşturuğu serbest radikallerin saptanmasında tetrazolium tuzlarının oluşumu prensibine dayanır. SOD aktivitesi ölçümü ticari kolorimetrik hazır kit kullanılarak yapılmıştır (Cayman Chemical Company, Katalog No: 7006002, Ann Arbor, USA). Reaksiyonların oluştuğu kolorimetrik plak BioRAD Benchmark Plus ELISA okuyucu ile 450 nm’de ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisinde belirlenen regresyon ve her örnek için kullanılan lineerize hız kullanılarak aktivite tanımı yapılmış ve sonuçlar Unite /mg yaş doku ağırlığı olarak verilmiştir (55).

3.4. İstatiksel Analiz

SPSS for Windows 10.0 istatistik paket programı uygulanarak istatistiksel karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis varyans analizi ve Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Grup I’de bulunan ve sadece akut pankreatit modeli oluşturulan kontrol grubu bu tür araştırmalar için tanımlanan “faktöriyel model” kullanılmak suretiyle analiz edilmiş, $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik İnceleme Sonuçları

Çalışmanın birinci haftasının tamamlandığı gün (7.gün) tüm deneklerden serum örnekleri alınmış ve daha sonra denekler sakrifiye edilerek pankreas doku örnekleme yapılmıştır. Pankreas dokusundan alınan ince kesitler HE ile boyanarak ışık mikroskopunda 20X ve 40X büyütmelemlerde incelenerek PMNL infiltrasyonu, pankreatik ödem, hemoraji, asiner hücrelerde dejenerasyon ve apoptotik hücre görülme oranlarına göre değerlendirilmiştir.

Deneklerin pankreas dokularındaki PMNL infiltrasyonu, ödem, ve hemoraji değerlendirilmesi için yapılan skorlama sonuçları Tablo 1’de gösterilmiş olup, PMNL infiltrasyonu, ödem ve hemorajide melatonin verilen gruplarda skorların düşük olduğu diğer gruplarda ie bu bulgulara belirgin artış olduğu gözlenmiştir.

Tablo 1: Pankreas dokusunda gözlenen PMNL infiltrasyonu, ödem ve hemoraji skorlarının dağılımı

	PMNL infiltrasyon skoru	Ödem skoru	Hemoraji skoru
Grup I	2.44±0.88	1.55±0.52	0.55±0.72
Grup II	2.0±0.75	1.37±0.51	0.12±0.35
Grup III	1.77±0.44	1.00±0.5	0.22±0.44
Grup IV	1.22±0.83	1.00±0.7	0.22±0.4

Gruplardaki asiner hücre dejenerasyonu skorları ve apoptotik cisimcikler içeren asiner hücrelerin (apoptozise giden hücreler) karşılaştırılması Tablo 2’de gösterilmiştir. Ekzojen melatonin verilen gruplarda hiç asiner hücre dejenerasyonu olmadığı gözlenmiştir.

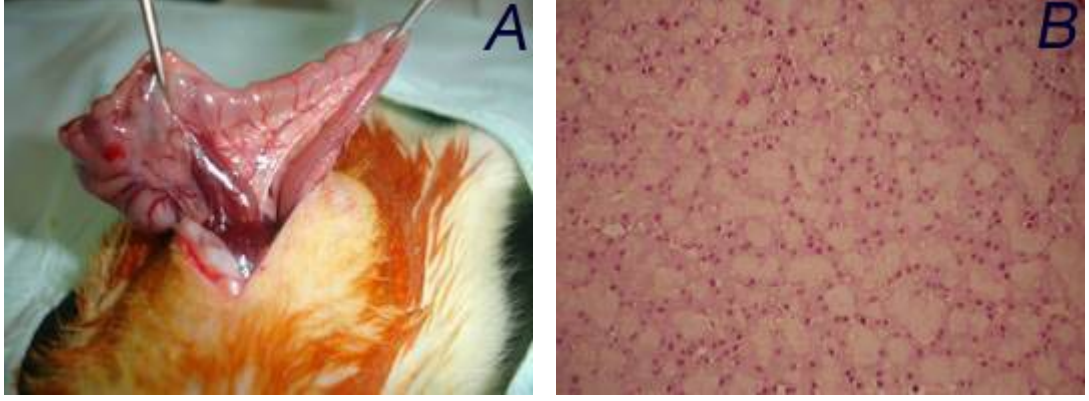
Tüm çalışma gruplarında; PMNL infiltrasyonu, ödem, hemoraji, asiner hücre dejenerasyonu ve apoptozis yönünden mikroskopik bulgulara göre yapılan skorlamalar kontrol grubu ile diğer gruplar arasında ve diğer gruplar kendi arasında değerlendirilmiş, sonuçta tüm gruplarda belirgin farklar olduğu tespit edilmiş olmakla birlikte bu farklılıklar bazı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamsız düzeyde, bazı gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur.

Deneysel akut pankreatit modeli uygulanan I. grup ratlarda ödem skorları ortalaması 1.55 ± 0.52 olduğu halde akut pankreatit ile birlikte pinealektomi yapılan ve ekzojen melatonin verilen III. gruptaki ratlarda pankreas dokusundaki ödem skor ortalaması 1.0 ± 0.5 düzeyinde kalmıştır. (t:2.24, p=0.036). Aynı şekilde asiner hücre dejenerasyonu yönünden bu iki grup arasındaki ortalama skorlar yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. (t:2.80, p=0.013). Asiner hücre dejenerasyonu grup III ve grup IV’de hiç gözlenmemiş olduğu için ekzojen melatonin verilen bu iki grup denek ile diğer gruplar arasında asiner hücre dejenerasyonu yönünden saptanan fark istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir. (t:2.18, p=0.00)

Tablo 2: Akut pankreatit geliştirilen deneklerde pankreas asiner hücrelerindeki dejenerasyon skorları ve apoptozis oranlarının dağılımı.

	Asiner hücre dejenerasyonu skoru	Apoptozis görülme oranı
Grup I	0.77 ± 0.83	30.55 ± 11.5
Grup II	0.37 ± 0.51	26.0 ± 16.91
Grup III	0.00	22.88 ± 10.7
Grup IV	0.00	12.77 ± 8.4

Benzer şekilde asiner hücrelerde apoptozis görülmesi yönünden de bazı gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yüksek melatonin kan düzeyli grup olan Grup IV ratlarda en düşük düzeyde (12.77 ± 8.4) saptanan apoptozis skoru kontrol grubu deneklerde en yüksek (30.55 ± 11.5) değere ulaşmaktadır. Pinealektomi yapılarak endojen melatonin’in devre dışı bırakıldığı ve ekzojen melatoninin verilmediği grup (Grup II) hariç kontrol grubuyla ekzojen melatonin verilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (Grup I ve IV için t:3.72, p=0.002) (Grup III ve IV için t:2.21, p=0.041).

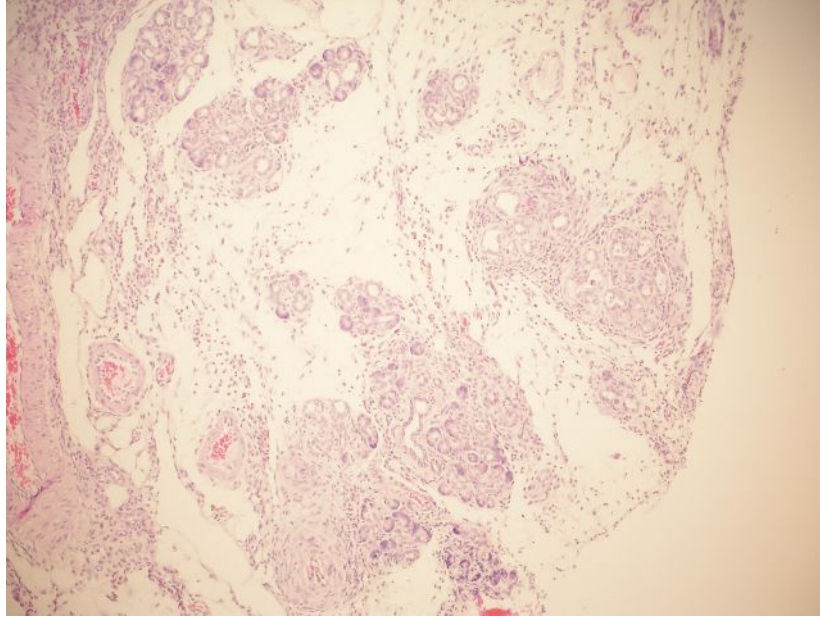


Şekil 5A/B: A) Deneklerde normal pankreas ve duktus yapısının makroskopik görünümü, B) Normal rat pankreas dokusunun ışık mikroskopik görünümü (HE x40)

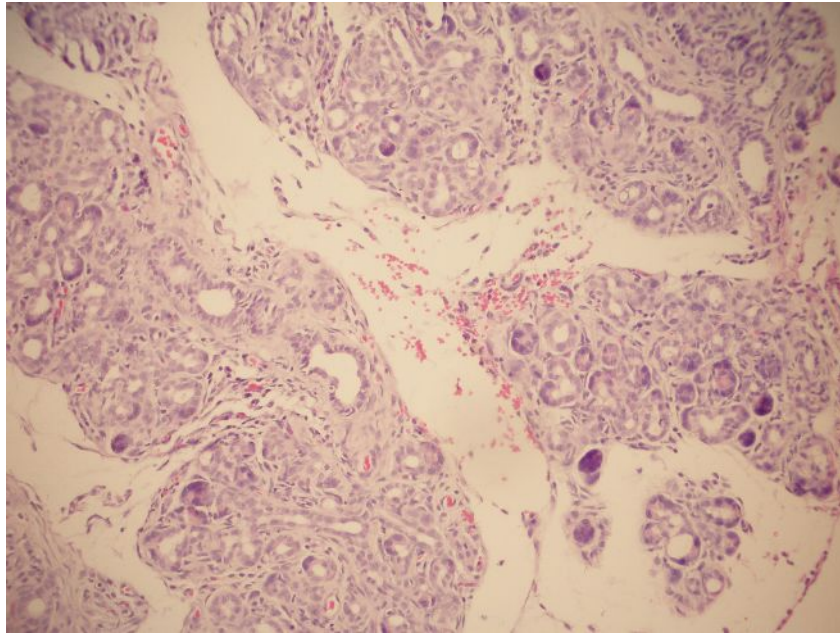


Şekil 6: Kontrol grubu ve tüm diğer deneklerde duktus ligasyonu sonrası koledokun dilate olduğu ve dokuda makroskopik şişme (ödem) bulguları tespit edilmiştir.

Herhangi bir işlem yapılmamış olan sıçanın normal pankreas dokusunda şekil 5B’de görüldüğü gibi lobüllerde ayrılımların olmadığı, asinus hücrelerinin bazal kısımlarının daha koyu, çekirdek üstü kısımlarının ise daha açık boyandığı, asinus lümenlerinin ve salgı kanallarının ise net bir şekilde ayırt edilemediği görülmektedir.



Şekil 7: Akut pankreatit geliştirilen deneklerde pankreasın mikroskopik görünümü. Belirgin PMNL infiltrasyonu ve ödem dikkati çekmektedir x10.

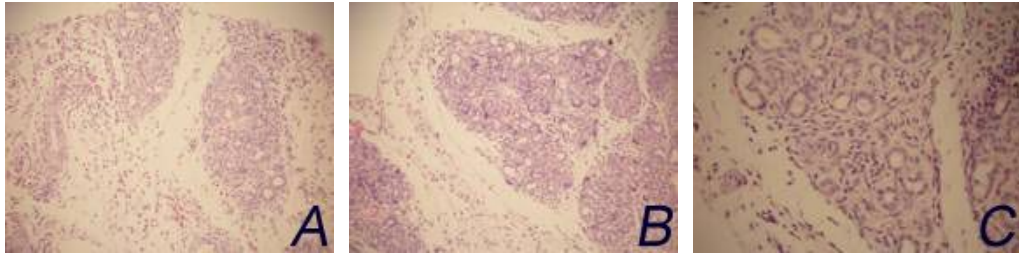


Şekil 8: Akut pankreatitte lobüllerdeki asiner genişlemeler, duktal transformasyonlar ve lobüller arası hemorajik alanların görünümü x20.

Akut pankreatitli grupta ekzokrin salgı yapan hücre topluluklarının küçüldüğü, lobüllerin birbirinden ayrıldığı, ödemin belirgin olduğu ve yaygın hücre infiltrasyonunun yer aldığı görüldü. Relaparotomi yapılan tüm deneklerde pankreas dokusu ve peripankreatik ödem makroskopik olarak da tespit edildi (Şekil 6). Akut pankreatitte pankreas dokularında lobüller arası ve lobül içi yaygın ödem olduğu,

polimorf nükleer lökosit ağırlıklı hücre infiltrasyonunun bazı deneklerde lobüller arasında, bazı deneklerde ise tüm pankreas dokusunda diffüz olarak gözlemlendiği saptanmıştır. Bazı alanlarda ise asiner hücre topluluklarının oldukça küçüldüğü saptandı (Şekil 7).

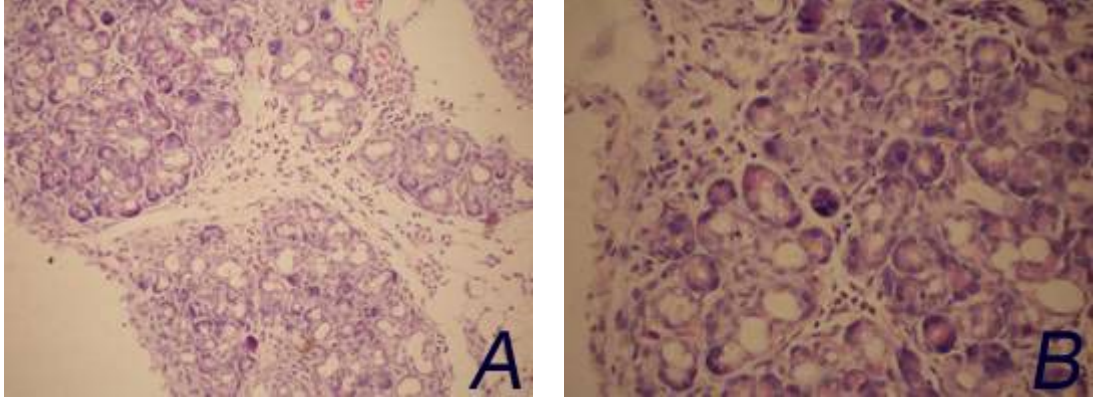
Akut pankreatitte asinus lümenlerinin çok genişleyerek oluşturduğu duktal transformasyon ve lobüller arasında az sayıda bulunan hemorajik alan görülmektedir. Hemorajik alanların -çok sık olmasa da- bazı deneklerde pankreatik lobüller arasında gözlemlendiği tespit edilmiştir. (Bkz Şekil 8).



Şekil 9A/B/C: A) Akut pankreatitte PMNL artışı, ödem, asinuslarda dejenerasyon x20, B) Ödeme bağlı Langerhans adacığının izolasyonu x20, C) Asinuslarda genişlemeler ve apoptotik cisimcikler görülmekte x40.

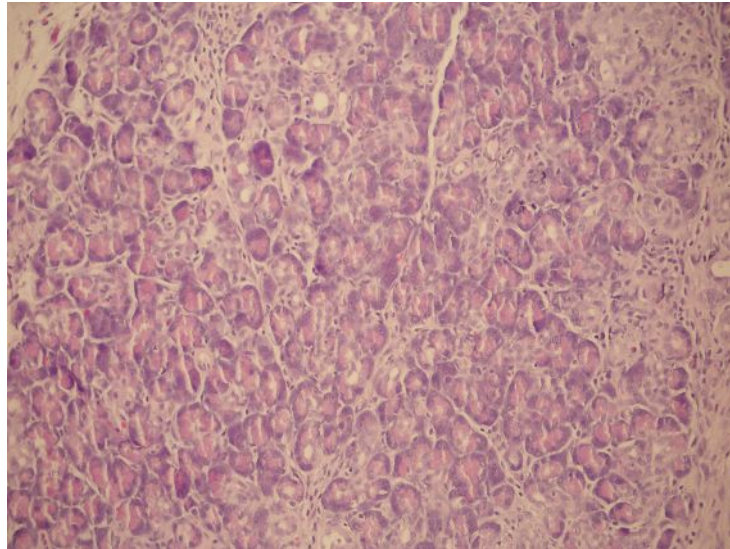
Akut pankreatitli ratlarda nötrofillerin baskın olduğu lökosit artışı, lobüllerde dejenere alanlar, aşırı dilate olmuş asinus lümenlerinde yassılaştırmış epitel hücreleri görüldü. Ödem ve PMNL infiltrasyonu nedeniyle genişlemenin çok fazla olduğu asinuslarda epitel yer yer yassılaştırmıştı. Bu gruptaki deneklerin bazılarında asinuslar arasında hücre dejenerasyonu olan alanlar mevcuttu (Şekil 9A). Bazı deneklerde pankreas dokusunda ileri derecedeki ödeme bağlı olarak Langerhans adacıklarının izole olduğu, asinuslardan ayrıldığı, ancak genel olarak yapısal bir bozulmanın olmadığı görüldü (Şekil 9B). Bu grupta ayrıca asiner hücrelerde artmış apoptotik cisimcikler izlendi (Şekil 9C).

Pankreatit + Pinealektomi uygulanan grupta (Grup II) mikroskopik olarak pankreas dokusunun akut pankreatitli I. gruba benzediği, pankreas kesitlerinde asinuslarda balonlaşmaların olduğu, lümenlerin genişlediği, dokuda ödem ve polimorfonükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonunun olduğu saptandı (Şekil 10A). Bu gruptaki deneklerin doku kesitlerinde asiner hücrelerdeki apoptotik cisimcikler varlığını sürdürmekteydi (Şekil 10B).

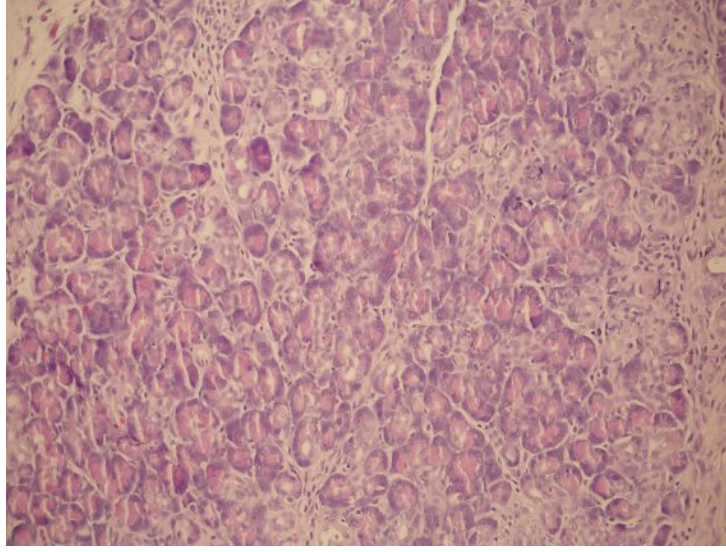


Şekil 10A/B: Grup II'deki deneklerde (melatonininden yoksunlaştırılmış grup) pankreas kesitlerinin görünümü (HE x20).

Pankreatit + ekzojen melatonin uygulanan yüksek melatonin kan düzeyli grupta (Grup IV) pankreatitli dokudaki ödemin ve hücre infiltrasyonun belirgin olarak azaldığı, hemorajik alanların minimal olduğu ve asiner hücre dejenerasyonunun ise hiç olmadığı tespit edildi. Ancak asinusların lümen genişlikleri (duktal transformasyon) devam etmekteydi (Şekil 13A). Bu gruptaki deneklerde asiner hücrelerdeki apoptotik cisimciklerde diğer gruplara göre oldukça azalmış olarak gözlendi (Şekil 13B). Deney gruplarının hiçbirinde asiner hücrelerde mitoz saptanmadı.

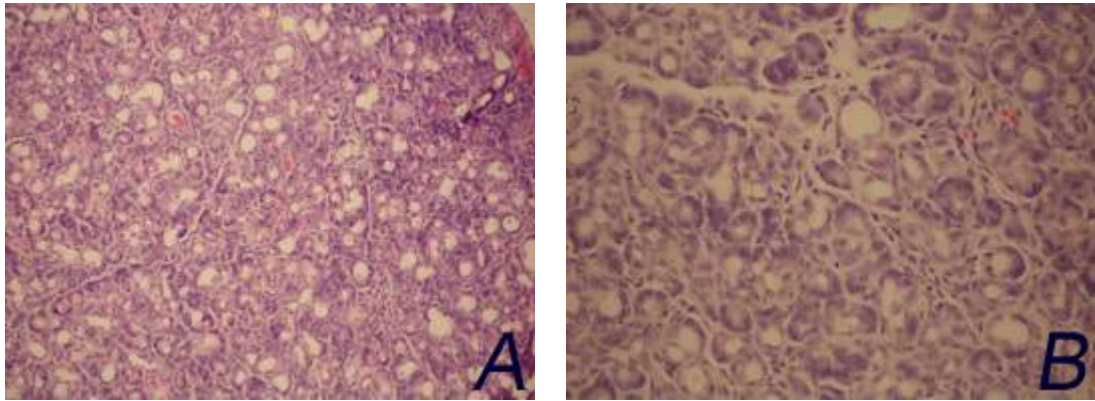


Şekil 11: Pankreatit + Pinealektomi + Melatonin uygulanan grupta akut pankreatit sonrası pankreas kesitlerinin mikroskopik görünümü (HE x40).



Şekil 12: Ekzojen melatonin uygulanan gruplarda pankreas bağ dokusunda belirgin artış gözlenmiştir x40.

Pankreatit + Pinealektomi + Melatonin uygulanan grupta (Grup III) asinus yapılarının genel olarak normal görünümünü koruduğu, dokuda ödem ve inflamasyonun azalmasının yanı sıra aynı şekilde dilate asiner yapıların da diğer gruplara göre daha az olduğu izlendi (Şekil 11). Grup III ve Grup IV'deki ratlarda, yani ekzojen melatonin verilen pinealektomili ve pinealektomisiz akut pankreatit modellerinde yer yer lobüller arası bağ dokusunun belirgin olduğu tespit edildi (Şekil 12).



Şekil 13A/B: Grup IV ratlarda pankreatitteki belirgin gerilemenin görünümü (HEx40).

Ekzojen melatonin kullanılan deney gruplarında (Grup III ve IV'de) apoptoze giden asiner hücre sayısının da belirgin olarak azaldığı saptanmıştır. Grup I'deki (kontrol grubu) ratlarda gözlenen apoptozis oranı ile Grup IV'deki (ekzojen

melatonin verilen yüksek serum melatonin düzeyli grup) ratlardaki apoptotik hücre oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir (t:3.72, p=0.002).

4.2. Biyokimyasal İnceleme Sonuçları

Akut pankreatit oluşturulan deneklerin kan örneklerinde AST, ALT, Amilaz, LDH enzimleri ile Total ve Direkt Bilirubin düzeyleri incelenmiş, doku örneklerinde ise MDA, GSH ve SOD düzeyleri analiz edilmiştir.

Serum örneklerinden elde edilen AST, ALT, Amilaz ve LDH enzim düzeyleri Tablo 3’de, Total bilirubin, indirek bilirubin ve direk bilirubin düzeyleri Tablo 4’de, doku örneklerinden elde edilen MDA, GSH ve SOD düzeyleri ise Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 3: Akut pankreatitli deneklerde AST, ALT, Amilaz, LDH enzim düzeyleri

	AST (U/L)	ALT (U/L)	Amilaz (U/L)	LDH (U/L)
Grup I	618.11±42.60	222.66±55.0	946.55±18.23	413.55±18.63
Grup II	520.25±30.81	219.37±95.6	2381.75±123.6	597.87±21.84
Grup III	389.66±35.79	428.88±33.11	869.22±20.02	558.77±20.21
Grup IV	114.66±47.7	520.55±30.76	357.55±17.7	292.55±16.98

(AST: Aspartat Transaminaz, ALT: Alanin Transaminaz, LDH: Laktat Dehidrogenaz)

Grup I’deki kontrol grubu ratlar ile diğer gruplar AST, ALT, Amilaz ve LDH enzim düzeyleri açısından karşılaştırıldığında AST değerleri açısından elde edilen verilerde Grup I, Grup II ve Grup III ile Grup IV arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu saptanmıştır. (Grup I ve Grup IV arasındaki fark için t:3.52, p=0.003). (Grup II ve Grup IV için t:3.91, p=0.001) (Grup III ve Grup IV için t:2.28, p=0.036).

Serum ALT değerleri akut pankreatit geliştirilen kontrol grubu ratlarda ortalama 222.6 U/L düzeyinde bulunmuştur. Çalışma grupları ALT düzeyleri yönünden karşılaştırıldığında ALT değerlerinin, AST düzeylerine paralel olarak düşmediği tam tersine bu enzim düzeyinin kontrol grubuna göre ekzojen melatonin uygulanan gruplarda daha da yükseldiği gözlenmiştir. Ancak bu enzim yüksekliği Grup III’de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı halde pinealektomi

yapılmamış olan yüksek melatonin düzeyli grupta (Grup IV) istatistiksel olarak anlamlı değerlere ulaşmaktadır. ($t:2.86$, $p=0.011$). Pinealektomi yapılarak endojen melatonin seviyesi daha da düşürülmüş olan ratlarda (Grup II) saptanan ALT düzeyi ile yüksek melatoninli ratlardaki (Grup IV) ALT düzeyleri arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur. ($t:2.64$, $p=0.018$).

Amilaz düzeyi akut pankreatit geliştirilen kontrol grubunda ortalama 946.5 U/L düzeyinde saptanmıştır. Amilaz değerlerinin pinealektomi eklenen gruplarda (Grup II ve III) yükselme eğiliminde olduğu, melatonin enjekte edilen grupta ise önemli oranda düştüğü gözlenmiştir. Amilaz değerleri açısından gruplar karşılaştırıldığında kontrol grubu ile Grup II ve Grup IV ratlar arasındaki farkın anlamlı olduğu saptanmıştır. Ancak Grup I ile Grup II arasındaki fark amilazın kan değerindeki artışı yönünde olduğu halde Grup I ile Grup IV arasındaki fark amilaz değerinin azalışı yönündeki istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir. Grup I ve Grup II arasındaki amilaz değerindeki artış yönünden yapılan istatistiksel analizde $t:3.4$, $p=0.004$, Grup I ile Grup IV arasındaki amilaz değerlerinin azalışı yönünden yapılan istatistiksel analizde $t:6.95$, $p=0.00$ bulunmuştur.

Benzer şekilde Grup II ve Grup III'deki serum amilaz değerlerine göre Grup IV'de oldukça düşük değerler saptanmış olup Grup II ve Grup III deneklerin hem birbiriyle hem Grup IV ile yapılan karşılaştırmalarında amilaz değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır. (Grup II ve Grup III için amilaz yönünden $t:3.63$, $p=0.002$), (Grup II ve Grup IV için amilaz yönünden $t:4.87$, $p=0.00$), (Grup III ve Grup IV için amilaz yönünden $t:5.73$, $p=0.00$).

LDH enzim düzeyleri yönünden gruplar karşılaştırıldığında akut pankreatit geliştirilen kontrol grubu ratlarda LDH düzeyi belli bir oranda yükseklik gösterdiği halde ekzojen melatonin verilmesi ve yüksek kan melatonin düzeyi sağlanmasıyla bu değer istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürüldüğü saptanmıştır. Grup I deki kontrol grubu ratlarda ortalama 413.55 U/L olan LDH düzeyi Grup II ve Grup III ratlarda 550 U/L'nin üzerine çıktığı halde Grup IV ratlarda 292 U/L düzeyine kadar düşmüştür. (Grup II ve Grup IV arasında LDH değerleri için yapılan istatistiksel analiz; $t:3.23$, $p=0.006$), (Grup III ve Grup IV arasında LDH değerleri için yapılan istatistiksel analiz; $t:3.02$, $p=0.008$).

Tablo 4: Deneysel obstruktif pankreatit modeli oluşturulan deneklerde serum bilirubin düzeylerinin gruplara göre dağılımı

	Total Bilirubin (mg/dl)	İndirek Bilirubin (mg/dl)	Direk Bilirubin (mg/dl)
Grup I	13.83±1.9	4.06±2.1	9.77±2.3
Grup II	18.18±3.7	6.94±3.5	11.24±3.4
Grup III	12.39±2.9	4.56±±2.8	7.83±2.7
Grup IV	5.67±2.4	2.57±1.6	3.10±1.1

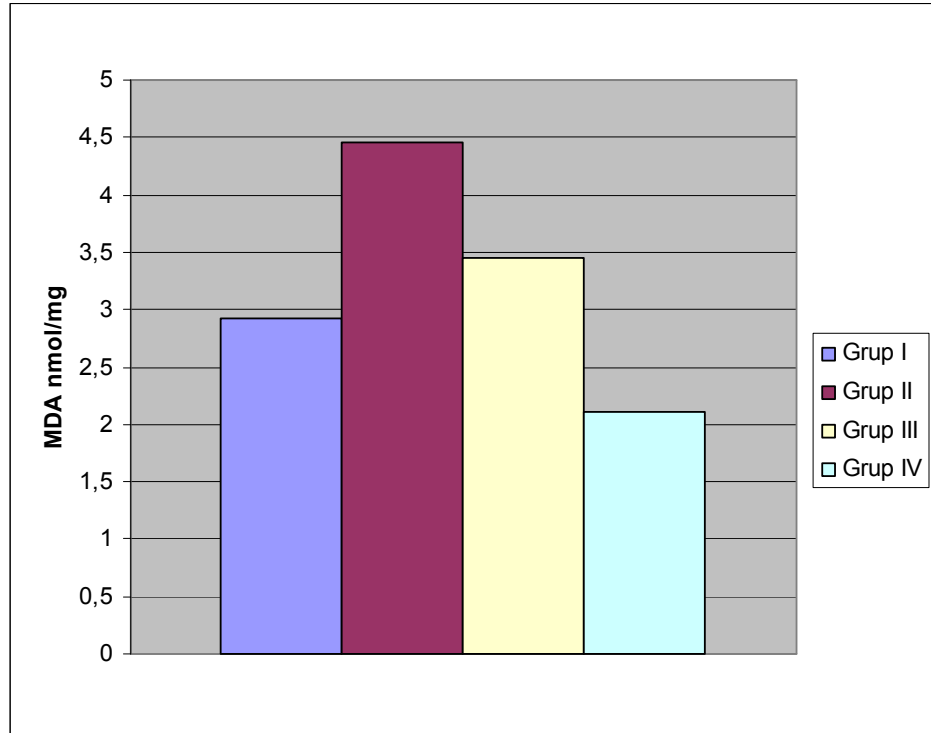
Akut pankreatit modeli yapılan ratlarda uygulanan cerrahi teknik safra ve pankreas ortak kanalının ligatüre edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu tekniğin başarıyla gerçekleştirildiğinin en somut göstergelerinden biri olan kan bilirubin düzeyleri de tüm deneklerde incelenmiş ve özellikle direk bilirubin komponentinde yükseklik tespit edilmiştir. Serum bilirubin değerleri kontrol grubu akut pankreatitli ratlarda direk bilirubin için ortalama 9.77 mg/dL, indirek bilirubin 4.06 mg/dL, total bilirubin ise 13.83 mg/dL bulunmuştur. Akut pankreatit prosedürüne pinealektomi eklenmesinin serum bilirubin değerini yükselttiği, ekzojen melatonin verilmesinin ise hiperbilirubinemiye engellediği gösterilmiştir. Tablo 4’de görüldüğü gibi II. Grup ratlarda total bilirubin düzeyi 18 mg/dL’ye çıkmış, Grup IV’de ise 5.67 mg/dL’ye inmiştir. Bilirubin düzeyleri açısından gruplar karşılaştırıldığında Grup I ile Grup II arasında, Grup I ile Grup IV arasında, Grup II ve Grup III ile Grup IV arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık olduğu saptanmıştır. İstatistiksel analiz sonucu elde edilen değerlere bakıldığında; Grup I ve Grup II için t:3.06, p=0.008, Grup I ve Grup IV için t:7.82, p=0.00, Grup II ve Grup IV için t:8.26, Grup III ve Grup IV için t:5.21, p=0.00 olarak saptanmıştır.

Akut pankreatit modeli uygulanan deneklerde doku örneklerinde oksidatif stresin göstergeleri olan MDA, GSH ve SOD sonuçları da değerlendirilmiş ve Tablo 5’de görülen sonuçlar elde edilmiştir. MDA düzeyi akut pankreatit modeli gerçekleştirilen kontrol grubu ratlarda 2.92 nmol/mg bulunmuştur. Pinealektomi eklenen Grup II ratlarda MDA düzeyinde iki katına yakın bir artış olduğu ve 4.45 nmol/mg düzeyine çıktığı görülmüştür. MDA değerleri açısından Grup I ve Grup II arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. (t:5.3, p=0.00).

Tablo 5: Akut pankreatitli deneklerde MDA, GSH ve SOD düzeyleri

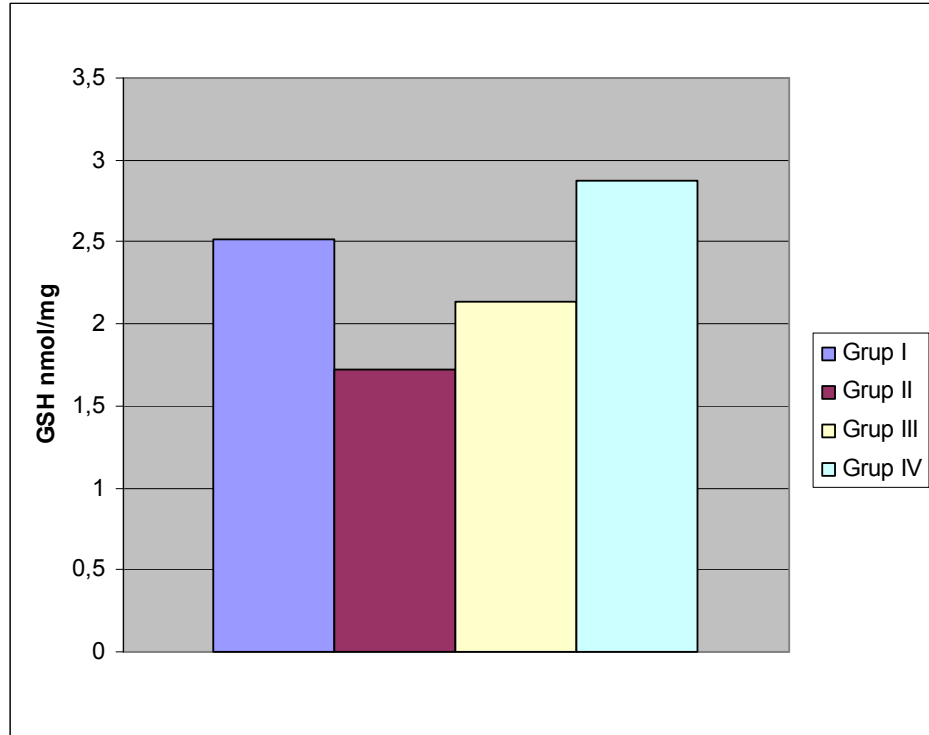
	MDA (nmol/mg)	GSH (nmol/mg)	SOD (U/mg)
Grup I	2.92±0.29	2.52±0.27	26.61±3.39
Grup II	4.45±0.81	1.72±0.19	21.51±2.22
Grup III	3.45±0.65	2.14±0.21	23.94±2.04
Grup IV	2.11±0.17	2.87±0.19	29.92±2.39

MDA düzeyindeki artma, Grup II'deki ratlarda gözleendiği kadar olmamakla birlikte benzer şekilde Grup III deki ratlarda da saptanmış ve ortalama 3.45 nmol/mg bulunmuş, Grup I ile Grup III arasında istatistiksel anlamlı düzeydeki farklılık devam etmiştir. (t:2.23, p=0.04). Melatonin düzeyi artırılması ile birlikte Tablo 5'de görüldüğü gibi Grup IV'deki ratlarda MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşüş saptanmıştır.(t:7.08, p=0.00).(Bkz. Şekil 14)



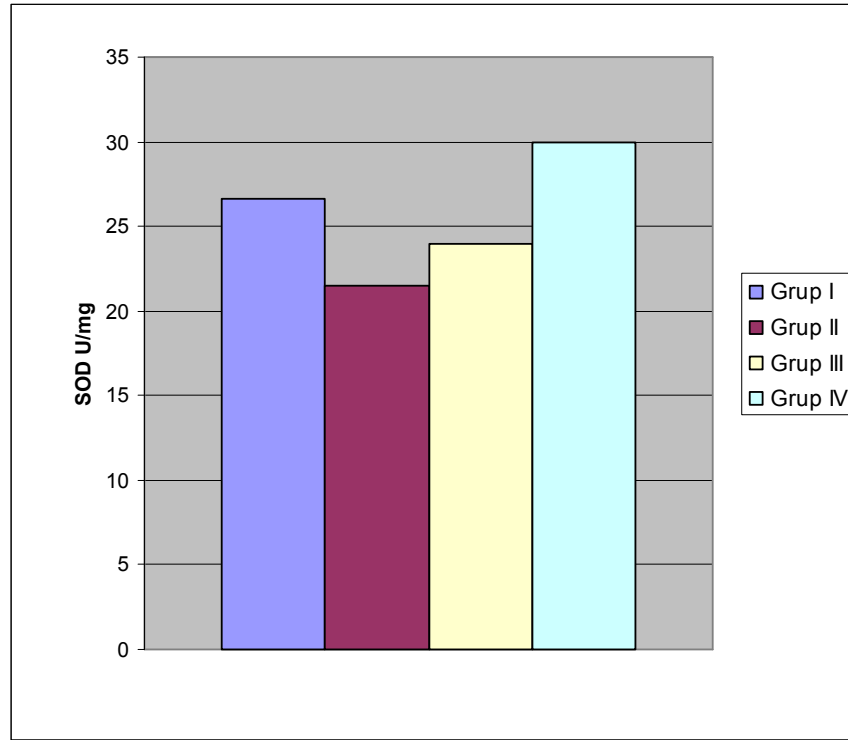
Şekil 14: Akut Pankreatitli Deneklerde MDA Düzeyleri.

GSH düzeylerinin Grup I'deki ratlarda 2.52 nmol/mg iken pinealektomi yapılan düşük melatonin seviyeli ratlarda 1.72 nmol/mg düzeyine indiği saptanmıştır. Ekzojen melatonin verilmesi GSH düzeylerini yükseltmiş ve Tablo 5'de görüldüğü gibi yeniden 2 nmol/mg değerinin üzerine çıkartmıştır. GSH düzeyleri yönünden tüm gruplar arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($t:6.70$, $p=0.00$). (Bkz. Şekil 15)



Şekil 15: Akut Pankreatitli Deneklerde GSH Düzeyleri

SOD değerleri yönünden incelendiğinde MDA değerlerine paralel bir artma ve eksilme düzeyleri gözlenmiştir. Kontrol grubu ratlarda ortalama 26.6 U/mg olarak saptanan SOD düzeyi ile Grup II ve Grup IV'deki ratlarda saptanan 23.9 U/mg ve 29.9 U/mg değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunmuştur. Grup I ve Grup II için saptanan $t:3.6$, $p=0.003$ 'tür. Grup I ve Grup IV için saptanan $t:2.3$, $p=0.029$ 'dur.



Şekil 16: Akut Pankreatitli Deneklerde SOD Düzeyleri

Pinealektomi yapılan ve ekzojen melatonin verilmeyen II. gruptaki (melatonininden yoksunlaştırılmış grup) ratlarda SOD düzeyi ortalaması diğer gruplara göre en düşük seviyede bulunmuştur. Bu grup ratlardaki SOD değerleri diğer gruplardaki değerlerle karşılaştırıldığında tüm gruplarla arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Grup II ve Grup III için $t:2.3$, $p=0.033$. Grup II ve Grup IV için $t:7.45$, $p=0.00$. Ekzojen melatonin verilen gruplardan pinealektomili grup olan Grup III ile pinealektomisiz grup olan Grup IV arasında SOD düzeyleri açısından değerlendirme yapıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. ($t:5.69$, $p=0.00$) (Bkz. Şekil 16)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Akut pankreatitte etyolojik ve fizyopatolojik faktörlerin çok çeşitli olması, insanlardaki hücresel ve mikrovasküler değişikliklerin hayvan modelleriyle benzerliği nedeniyle, hastalığın patofizyolojisini ortaya koymak ve yeni tedavi seçenekleri geliştirebilmek için çok sayıda invaziv ve noninvaziv deneysel akut pankreatit modeli geliştirilmiştir. Akut pankreatitin en sık nedeninin safra taşları olması nedeniyle deneysel pankreatit için uygulanan metodların çoğunluğunu invaziv bilier pankreatit modelleri oluşturur. Bu tür deneysel akut pankreatit modelleri için en sık kullanılan hayvanlar ise biliopankreatik anatomisinin özellikleri insanlara benzerlik göstermesi nedeniyle sıçanlardır (56).

Cerrahi ligasyon ile oluşturulan akut pankreatit modelinin seçilmesinin nedeni; kanal ligasyon modelinde safra taşlarının neden olduğu klinik durum, sfinkter motilite bozukluğu, papillada ödem ve striktür, tümör ve parazite bağlı tıkanıklığın klinik olarak insandakine benzerlik taşımasıdır (57,58). Sıçanda biliopankreatik kanalın ligasyonu ile kolanjit, obstrüktif sarılık, erken pankreatit gelişir ve insandakine benzer multipl organ yetmezliğine giden bir klinik sendroma neden olur. Karakteristik olarak, pankreatik nekroz ve hemoraji, lökosit infiltrasyonu ve akciğer, mide, böbrek gibi organlarda multipl mikrotrombüsler oluşur (57).

Safra ve pankreatik sıvının duodenuma akışının engellenmesi, duodenumdan kolesistokinin (CCK) salınımının feedback inhibisyonunu ortadan kaldırır ve sirkülasyondaki CCK konsantrasyonunu artırır. Bunun ekzokrin pankreasın aşırı uyarılmasına neden olduğu ve obstrüksiyonla oluşturulmuş pankreatitin şiddetinin arttığı belirtilmektedir (59). Yalnız safra kanalı obstrüksiyonu veya pankreatik kanal obstrüksiyonuna karşılık kombine obstrüksiyonda, CCK salınımının ve pankreatitin şiddetinin daha fazla arttığı belirlenmiştir (59). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ortak safra yolu ve pankreatik kanalın ligasyonu sonrası ilk 24 saatte morfolojik değişikliklerin meydana geldiği saptanmıştır. Lerch ve arkadaşları, pankreatik kanal ligasyonu sonrası 3 saat içerisinde asiner hücre nekrozu, 12 saat içerisinde yağ nekrozu, hemoraji ve inflamasyonun geliştiğini göstermişlerdir (60). Çalışmamızda ana safra kanalı ve pankreatik kanal obstrüksiyonu sonrası akut pankreatit oluşturulan I. grupta asiner hücre nekrozu, lökosit infiltrasyonu, hemoraji ve ödem belirgin olarak gözlenmiştir.

Akut pankreatitte ortaya çıkan değişiklikler (tripsinojen aktivasyonu, pankreas enzimlerinin ve proinflatuar sitokinlerin plazmada yükselmesi, parankimal nekrozun görölmesi, organ disfonksiyonlarının ortaya çıkması) insan ve sıçanda karşılaştırıldığında, sıçanlarda tedaviye pankreatitin 6. saatinden sonra başlanması gerektiği bilinmektedir. Bu süre insandaki semptomların başlamasından sonraki 24 - 48. saatlere karşılık gelmektedir (56). Bizim çalışmamızda, cerrahi ligasyon ile pankreatit oluşturulduktan sonra tedavide etkinliğini araştırmak amacıyla kullanılan melatonin enjeksiyonu 24. saatte intraperitoneal olarak uygulanmaya başlanmıştır.

Melatonin, serbest radikal tutucu ve yüksek antioksidan etkilidir. Melatonin bu etkileriyle hücreleri oksidatif hasardan korur, inflamasyonu azaltır ve doku ödemi geriiletir (6). Bizim çalışmamızda, obstruktif akut pankreatit modeli oluşturulan ratlarda, kullanılan melatonin'in etkisiyle deneklerin 1.haftanın sonunda incelenen pankreas dokularının histopatolojik bulgularında literatür ile uyumlu olarak PMNL infiltrasyonu, ödem, hemoraji ve inflamatuvar değişikliklerin önemli oranda baskılandığı gösterilmiştir. Pankreatit ve pinealektomi uygulanan melatoninden yoksunlaştırılmış II. Grup ratların pankreas dokusunun sadece pankreatit oluşturulan I. Gruba (kontrol grubu) benzediğı, dokuda PMNL infiltrasyonu, ödem, hemoraji ve asiner hücrelerde dejenerasyon olduğı; Pankreatit ve ekzojen melatonin uygulanan IV. grupta, dokudaki ödem ve hücre infiltrasyonun belirgin olarak azaldığı, hemorajik alanların ve asiner hücre dejenerasyonunun hiç görölmediğı tespit edilmiştir. Pinealektomi yapılarak endojen melatonin kaynağı ortadan kaldırılan, ancak 20 mg/ml solusyonundan 0.1 ml ekzojen melatonin verilen akut pankreatitli ratlarda (Grup III) asiner hücrelerin genel olarak normal yapısını koruduğı, ancak lobüller arası bağ dokusunda belirgin artış olduğı gözlenmiştir (Bkz Şekil 11).

Apoptosis normal fizyolojik bir olay olup bu terim ile DNA hasarıyla karakterize nükleus parçalanması sonucu olan genetik olarak programlanmış kontrollü hücre ölümü anlatılmaktadır. Akut pankreatit aktive lizozomal enzimlerin etkisiyle veya tripsinojenin otoaktivasyonu ile gelişmektedir. Tripsin ile aktifleşen zimojenler doku hasarına neden olurlar (5). Akut pankreatitte görölün apoptosis ve hücre nekrozu morfolojik olarak farklılık gösteren hücre ölümünün iki değişik

formunu oluşturur. Apoptozis, hücrenin büzülüp nükleer membranın parçalanarak genomik DNA'nın hasarlanması sonucunda çekirdek kromatini dağılmasıyla apoptotik cisimlerin oluşması (58) ile karakterize genetik programlanmayla yönlendirilen hücre ölümüdür (61). Pankreas, parotis ve böbrek gibi bazı parankimatöz organlarda kanaliküler yapıların obstrüksiyonu sonucu gelişen atrofilerde histopatolojik olarak yaygın apoptozis gözlenir (23).

Tablo 2'de görüldüğü gibi ekzojen melatonin kullanılan ratlarda (Grup III ve IV'de) apoptozise giden asiner hücre sayısında belirgin azalma mevcuttur. Grup I'deki ratlarda gözlenen yüksek apoptozis oranı ve Grup IV'deki ratlarda gözlenen düşük apoptozis oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark saptanmış olup bu bulgu ekzojen melatoninin apoptozisi azalttığı şeklinde yorumlanmıştır.

Melatoninin apoptozisi hangi mekanizma ile azalttığı veya bu azalmanın akut pankreatit fizyopatolojisinde ne gibi etkileri olduğu konusunda çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Kaiser ve arkadaşları akut pankreatitte apoptozis gelişiminin pankreas kanallarının obstrüksiyonu sonucu oluştuğunu ve pankreasta atrofiye yol açtığını bildirmişlerdir (62). Pankreatik kanal obstrüksiyonu sonucu oluşan akut pankreatit modellerinde asiner hücre apoptozisinin aslında bir savunma mekanizması olduğu ve pankreatik atrofi sonucu enzim sekresyonlarının azalmasına dolayısıyla pankreatitin önemli komponentlerinden biri olan enzimatik faaliyetlerinin azalmasına yol açtığı bildirilmektedir (58,62). Akut pankreatit'te artmış sitokinlerden özellikle TNF- α apoptozisi arttırıcı bir etki göstermektedir (61).

Jaworek ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, melatoninin lipid peroksidasyonu ve pankreatik ödemi azalttığı, IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α ve Amilaz konsantrasyonlarını baskıladığı gösterilmiştir (63). Fujimoto ve arkadaşları iskemi reperfüzyon çalışmalarında 24. saatte pankreas asini hücrelerinde apoptozisi saptamışlardır (64). Yine iskemi reperfüzyonla yapılan başka bir çalışmada, iskemik hasar öncesi ve sonrası olmak üzere önleyici ve tedavi edici melatonin uygulaması sonrasında oksidatif stres ve pankreas doku hasarı üzerinde sitoprotektif etkili olduğu saptanarak hücre fonksiyonlarını düzelttiği gözlenmiştir. Bu nedenle melatonin'in karaciğer, beyin, myokard, barsak ve böbreklerde iskemi reperfüzyon hasarı üzerine yapılan çalışmalarda, melatoninin doku hasarını önlediği gösterilmiştir (65). Bizim çalışmamızda, III. ve IV. gruptaki deneklerde apoptozis oranının azalmasına paralel

olarak asiner hücre dejenerasyonunun diğer gruplarda olduğu kadar gelişmediği görülmüştür (Bkz. Tablo 2). Bu bulgu ekzojen melatonin verilmesinin ratlardaki asiner hücre dejenerasyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı şeklinde yorumlanmıştır.

Ekzojen melatonin verilmesiyle organizmada tüm dokularda yüksek melatonin düzeyi sağlanmış olmaktadır. Canlı organizmada normalde melatonin düzeyleri bazı organ ve dokularda birbirinden farklıdır. Melatonin pineal gland dışında barsaklardan da salgılanmakla birlikte asıl melatonin kaynağının pineal gland olduğu bilinmektedir. Konturek ve arkadaşlarının ¹²⁵I-Melatonin ile yaptıkları immünoaktif çalışmalarda (41,43), ratlarda doku homojenatlarında melatonin konsantrasyonlarının barsaklarda pineal glanda oranla oldukça düşük düzeyde olduğu saptanmıştır. Melatonin salınımının barsaklarda pineal glanda göre 20 kat daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Barsaklardaki melatonin doku düzeyleri melatonin prekürsörlerinin oral alımından direk olarak etkilendiği halde pineal glanddaki yüksek melatonin düzeyleri bu maddelerin alımından dolayı olarak ve düşük oranda etkilenmektedir. Melatonin prekürsörü olan triptofanın oral alımı ile melatonin doku konsantrasyonlarının barsak ve karaciğerde 10 kat arttığı halde pineal glandda sadece 6 kat arttığı gözlenmiştir. İlk önce Pinealektomi yapılan ve sonrasında triptofan verilen ratlarda portal ven ve gastrointestinal kanalda melatonin seviyesi etkilenmemiş, fakat parsiyel portal ven ligasyonu sonrası büyük oranda melatonin düzeyi düşüşü saptanmıştır. Ratlarda yapılan çalışmalarda çöliak arterden verilen radyoaktif ¹²⁵I-Melatonin alımını takiben 15.sn'de karaciğer, mide, ince barsak (duodenum, jejunum, ileum) ve kolon mukozasında; 30. sn'de karaciğer ve safrada yüksek oranda melatonin saptanmıştır. Bütün çalışmalarda safradaki konsantrasyonunun portal venden daha yüksek olduğu gösterilmiştir (41,43). Bu durum melatonin'in safra ile sekresyonunun önemli olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla ekzojen olarak verilen melatonin'in karaciğer ve safrada konsantrasyonunun özellikle yüksek olduğu ve etkisinin hepatobiliyer sistemde belirgin olacağı şeklinde yorumlanmıştır.

Melatonin, gastrointestinal kanal mukozasında, hepatopankreatik metabolizmada kısa sürede indole metabolize olmaktadır. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda oral yoldan verilen melatonin doku konsantrasyonları

ölçüldüğünde; gastrik, duodenal, jejunal ve ileal mukozada yüksek düzeyde, karaciğer ve pankreasta daha az, özofagus ve oral mukozada ise çok daha düşük düzeyde olduğu saptanmıştır. Pineal glandı alınan ratlarda sistemik dolaşımda plazma immunreaktif melatonin konsatrasyonu çok düşük olduğu halde, portal vende yüksek melatonin seviyesine rastlanmıştır (41,43). Bu bulgu, enteral melatonin yapımının en önemli göstergesidir. Oral olarak alınan triptofanın melatonin prekürsörü olarak özellikle akut gastrik lezyonlarda etkinliği gösterilmiş olup bu madde hızla melatonine dönüşerek lipid peroksidasyonunu azaltmakta, antioksidatif enzimleri aktive ederek serbest radikalleri tutucu etkisiyle yüksek gastroprotektif etki göstermekte ve oksidatif strese bağlı gastrik lezyonları engellemektedir (43,66,67). Ekzojen melatonin ve L-triptofan'dan üretilen endojen melatonin, akut pankreatitte oksidatif stresten organı koruyup doku hasarını azaltarak pankreatikoprotektif etki göstermektedir (68).

Antioksidanlar yüksek dozda kullanıldığında organizmada oldukça ciddi yan etkilere ve toksisiteye neden olabilmektedir. Melatonin, diğer antioksidanların aksine çok yüksek dozlarda ve uzun süre kullanımında bile toksik bir etki göstermemektedir (43). Bizim çalışmamızda, pinealektomi yapılarak melatonin seviyesini düşürüp ekzojen melatonin enjeksiyonu yapılan III. grup ve pinealektomi yapılmaksızın ekzojen melatonin enjeksiyonu ile maksimum melatonin seviyesi elde edilen IV. grupta, 7 gün boyunca oldukça yüksek dozda melatonin enjeksiyonu uygulamamıza rağmen deneklerin hiçbirinde toksik etki gözlenmemiştir.

Deneyssel akut pankreatit oluşturulan ratlarda AST ve ALT gibi enzimlerde belirgin artış olduğu ve AST'nin ortalama 618 U/L, ALT'nin ise 222 U/L düzeyine çıktığı gözlenmiştir. Tablo 3'de görüldüğü gibi işleme pinealektomi eklenmiş olması özellikle AST düzeylerindeki bu artışın daha düşük seviyede kalmasına neden olduğu, ekzojen melatonin verilmesiyle bu enzimdeki düşmenin daha da belirgin olduğu ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Ancak benzer düşme ALT değerlerinde saptanmamış olup tam tersine ALT düzeylerinin ekzojen melatonin verilen gruplarda kontrol grubuna göre arttığı tespit edilmiştir. Tablo 3'de görüldüğü gibi ALT düzeyleri kontrol grubunda ortalama 222 U/L iken pinealektomi grubunda önemli bir değişikliğe uğramadan bu düzeylerde kalmış (219 U/L), ekzojen melatonin verilmesiyle birlikte Grup III ve Grup IV'deki ratlarda ise düşmediği gibi

istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir. Hepatosit nekrozunun önemli göstergelerinden biri olan ve daha çok karaciğere spesifik doku hasarını gösteren AST ile karaciğer, böbrek, pankreas veya kas dokularındaki hücresel hasar, fibrozis olaylarında arttığı tespit edilen ALT ile ilgili benzer çalışmalarda genellikle AST ve ALT düzeylerinde paralel artışlar tespit edildiği halde bizim çalışmamızda AST ve ALT düzeyleri yükseldikten sonra ekzojen melatonin verilmesiyle ALT düzeyinin düşmediği ve tam tersine arttığını görmekteyiz (Bkz Tablo 3). AST ve ALT değerlerindeki paralel bulguların elde edildiği çalışmalarda melatonin'in veriliş yolu intravenöz veya intramuskuler uygulama şeklindedir. Bizim yaptığımız deneysel çalışmada ALT değerlerinde gözlenen kalıcı yükseklik; melatonin'in sistemik olarak verilmeyip intraperitoneal yoldan uygulanmış olması nedeniyle etkisini daha çok karaciğer üzerinde gösterdiği ve ekstrahepatik parankimatöz organlarla kas dokusunda etkili olamadığı için ALT düzeylerinde düşme sağlayamadığı şeklinde yorumlanmıştır. Ekzojen melatonin verilen gruplarda biyokimyasal incelemelerde elde edilen bu ilginç bulguya ek olarak bu grupta histopatolojik incelemelerde gözlenen diğer önemli bulgular ise ödem ve apoptozisin azalması, hücre dejenerasyonunun hiç görülmemesi ve lobuller arası bağ dokusunda artış saptanmış olmasıdır. Bu bulguları ALT yüksekliğiyle birlikte değerlendirdiğimizde pankreatit oluşturulduktan sonra ekzojen melatonin verilmesinin hepatosit hasarını önleyici veya yok edici etkisinden bağımsız olarak dokuda lobuller arası bağ dokusu artışı üzerinde hiçbir önleyici etkisinin olmadığı ve biliyer obstrüksiyon sonucu gelişen fibrozis nedeniyle ALT değerlerinde yükselmeye yol açtığı kanaatine varılmıştır.

LDH, doku iskemisine duyarlı bir enzimdir. Biliopankreatik kanal obstrüksiyonu sonucu ratlarda geçici iskemi ve reperfüzyon hasarından sonra meydana gelen pankreatik hasarın patogenezinde geçici pankreatik iskemi reperfüzyonun ve serbest oksijen radikallerinin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. LDH, akut pankreatitli olgularda pankreatitin şiddetine bağlı olarak artmaktadır (59). Bizim çalışmamızda, akut pankreatit oluşturulan I. grupta, melatoninden yoksun II. grup ve ekzojen melatonin verilen III. grupta LDH seviyesinde belirgin yükseklikler tespit edilmiş, yüksek melatonin düzeyine sahip IV. grupta bu değerin anlamlı olarak düştüğü saptanmıştır. İlk 3 grubun aralarında anlamlı fark olmasına rağmen, LDH

değerlerinin IV. gruba oranla diğer gruplarda belirgin olarak yüksek saptanması, pankreatik dokunun iskemi reperfüzyon sonucu hasara uğradığı, IV. gruptaki belirgin düzelmenin ise melatonin verilmesinin etkisiyle ve iskemi ve nekroz üzerine melatonin'in sitoprotektif veya tedavi edici etkisi olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Akut pankreatit tanısında en sık kullanılan biyokimyasal markerlarından birisi serum amilaz düzeyindeki yükselmedir. Serum amilaz aktivitesinin normal sınırların en az 3 katından fazla olması akut pankreatit tanısını destekleyici bir bulgudur. Bu aktivite genellikle ilk 12 saat içinde yükselmeye ve 3-5 gün sonra düşmeye başlar. Serum amilaz aktivitesi, örneğin kronik alkol kullanımına sekonder gelişen pankreas ekzokrin salgısındaki bozukluklarda %9-32 oranında normal düzeylerde saptanabilir. Bu nedenle spesifisitesi yaklaşık %95 olduğu halde, sensitivitesi daha düşük olup %61 düzeyindedir (69).

Bazı çalışmalarda sağlıklı organizmada ekzojen melatonin verilmesi amilaz aktivitesinde belirgin artışa neden olduğu halde, deneysel akut pankreatit oluşturulan ratlarda melatoninin lipid peroksidasyonunu ve doku ödemi azalttığı, amilaz aktivitesinde düşmeye neden olduğu tespit edilmiştir (68,70). Szabolcs (71), Eşrefoğlu (2) ve Jaworek (63), yaptıkları çalışmalarda sağlıklı organizmada melatonin uygulaması sonrası kan amilaz değerlerinde tam tersine anlamlı azalma tespit etmişlerdir. Dolayısıyla melatonin verilmesinin amilaz düzeyleri üzerindeki etkisi konusunda elde edilen sonuçlar oldukça farklılık göstermektedir. Bizim çalışmamızda Tablo 3'de görüldüğü gibi akut pankreatit modeli oluşturulan I.grup ratlarda (kontrol grubu) deneysel işlemin 7.gününün sonunda ölçülen serum amilaz değerlerinin minimum 717 U/L ile maksimum 1262 U/L arasında değiştiği, ortalama amilaz düzeyinin 946 U/L olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre amilaz yüksekliği deneklerde akut pankreatitin başarıyla oluşturulmuş olduğunu destekleyen biyokimyasal bir bulgu olarak değerlendirilmelidir.

Pinealektomi uygulanan deneklerde ise serum amilaz düzeyinin çok yüksek değerlere ulaştığı ve minimum 1071 U/L, maksimum 4358 U/L olup ortalama 2381 U/L olduğu görülmüştür. Bu durum endojen melatonin kaynağı olan pineal glandın devre dışı bırakılarak serum melatonin düzeyinin düşürülmesinin veya normalin altına indirilmesinin akut pankreatit şiddetini arttırdığı şeklinde yorumlanmıştır.

Ekzojen melatonin vermek suretiyle kan melatonin düzeyi arttırılan akut pankreatit modellerinde ise (Grup III ve Grup IV) amilaz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde bir düşüş saptanmıştır. (Bkz. Tablo 3) Alhan ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada akut pankreatitte pankreatik nekroz, mortalite ve serum amilaz değerleri üzerine melatoninin anlamlı bir etkisinin olmadığı belirtilmektedir (1). Bizim çalışmamızda, I. ve II. gruplarda amilaz seviyelerinde belirgin yükselme tespit edilmiş, melatonin uygulanan III. ve IV. gruplarda ise amilaz seviyelerinde anlamlı azalma saptanmıştır. Akut pankreatit ve pinealektomi yapılarak melatonin düzeyinin en düşük düzeye indirildiği II. grupta, sadece akut pankreatit geliştirilmiş olan ve normal melatonin düzeyine sahip I. gruba göre belirgin yükseklik elde edilmiştir. Melatonin seviyesinin en yüksek olduğu IV. grupta, en düşük olduğu II. grup ve normal olduğu I. gruba göre anlamlı azalma tespit edilmiştir. Bu verilere dayanarak ekzojen melatonin verilmesinin normal organizmada amilaz düzeyini arttırıcı bir etkisi olduğu halde akut pankreatit vb. etkenlere bağlı olarak yükselmiş olan amilaz değerleri olan organizmalarda amilazı azaltıcı bir etki yaptığını söylemek mümkündür.

Biliopankreatik kanalın ligatüre edildiği ratlarda akut pankreatitin yanı sıra aynı zamanda obstrüktif ikter de gelişmektedir. Safra yollarındaki tıkanıklığa bağlı olarak intra ve ekstrahepatik safra kanallarında genişleme ve basınç artışı, safra akışının bozulmasına bağlı olarak total ve konjuge bilirubin seviyelerinde artış, karaciğer fonksiyon testlerinde (AST, ALT) artışa neden olur. Bizim çalışmamızda da, sakrifiye edilen deneklerin relaparotomileri yapıldığında tüm deneklerde safra kanallarında makroskopik olarak belirgin dilatasyon olduğu izlenmiştir (Şekil 6). Deneklerin bilirubin düzeyleri karşılaştırıldığında, tüm deneklerde özellikle konjuge bilirubin düzeylerinde önemli oranda artış saptanmıştır. Bu durum ana safra kanallarının (koledok) cerrahi ligasyon işleminin doğal bir sonucudur. I. , II. ve III. Grupların tümünde bilirubin değerleri yüksekliği saptansa da melatoninden yoksun olan II. grupta serum bilirubin değeri en yüksek düzeye ulaşarak ortalama 18,18 mg/dl olmuş, buna karşılık ekzojen melatonin verilen IV. grupta serum bilirubin değerinde göreceli bir düşme saptanmış, bu grupta total bilirubin düzeyleri ortalama 5,67 mg/dl düzeyine kadar inmiştir. (Bkz Tablo 4) Melatoninin bilirubin düzeyleri üzerine azaltıcı etkisi konusunda gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı

düzeydedir. Bu bulgu ile karaciğer ve safraya yüksek oranda geçiş gösterebilen melatoninin intraperitoneal yoldan verilmesi sonucunda tıkanma sarılıklarında meydana gelen hiperbilirubinemiye, oksidatif hepatosit hasarını ve hepatobiliyer fonksiyon bozukluğunu önleyici etkisi olduğu ortaya konulmuştur.

Akut pankreatitte doku hasarına bağlı olarak ortaya çıkan inflamatuvar sitokinlerin etkisiyle serbest oksijen radikalleri, hücre zarındaki fosfolipidlerin yapısını bozmakta ve membran lipidlerinin peroksidasyonuna neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan metabolitlerin tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmeleri sonucu MDA oluşur (72). Akut pankreatit'te lipid peroksidasyonunun artması ve pankreatit şiddeti ile oksidatif stres arasında bir korelasyon olduğu bilinmektedir (30). Weber ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Akut pankreatitte oksijen türevleri membran lipidlerinin belirgin peroksidasyonunu başlattığı gösterilmiştir. Bu etki sonucu MDA düzeyinde ilk 30 dakika sonunda anlamlı bir artış başladığı ve bu artışın 16 saat kadar sürdüğü gösterilmiştir (73).

Çalışma grubumuzda MDA, GSH ve SOD değerleri birlikte incelendiğinde kontrol grubu akut pankreatitli ratlarda saptanan yüksek serum düzeylerinin II. ve III. grupta istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düştüğü saptanmış olmasına rağmen aynı bulgu IV. grup ratlarda MDA değerlerinde gözlemlendiği kadar belirgin değildir. Tablo 5. de görüldüğü gibi kontrol grubu akut pankreatitli deneklerde belli bir düzeye çıkan MDA değerlerinin işleme pinealektominin ilave edilmesiyle istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yükseldiği, buna karşılık GSH ve SOD düzeylerinin düştüğü saptanmıştır. MDA, GSH ve SOD düzeyleri ile ilgili bu bulgular melatoninin etkisi ile ilgili yapılmış çalışmaların sonuçları ile uyumludur (72). Bu sonuçlar bizim çalışmamızda pinealektomi yapılarak organizmada ikinci bir lipid peroksidasyon hasarı meydana getirildiği ve MDA düzeyinin buna bağlı olarak yükseldiği şeklinde yorumlanmıştır. Ancak aynı şekilde pinealektomi yapılan III. gruptaki akut pankreatitli ratlarda melatonin verilmesiyle elde edilen MDA düzeyi düşüşü ve pinealektomi yapılmayan I.ve IV grup ratlar arasındaki MDA düzeyi farkının istatistiksel olarak anlamlı olması melatonin'in MDA düzeyini düşürücü etkisi olduğunu ortaya koymuştur.

Chen ve arkadaşları yaptıkları deneysel çalışmada, cerulein ile oluşturulan akut pankreatit gruplarında pankreatik MDA düzeyinin yükseldiğini, GSH seviyesinin düştüğünü; melatonin verilmesinin ardından MDA seviyelerinin düşmesine karşılık GSH seviyesinin arttığını saptamışlardır (72). Bizim çalışmamızda da, bu sonuçlarla uyumlu olarak melatonin'den yoksun grupta MDA en yüksek, GSH en düşük seviyede iken melatonin verilmesini takiben MDA değerinde anlamlı bir düşme, GSH seviyelerinde ise yükselme olduğu gözlenmiştir.

Doku homojenatlarında artmış MDA içeriğinin gösterilmesi ana safra kanalı bağlanmış ratlarda artmış lipid peroksidasyonunun göstergesidir (29). Lipid peroksidasyonu geleneksel olarak MDA ölçümü ile değerlendirilmektedir. Güçlü bir antioksidan olan Melatonin molekülü, kolaylıkla oksitlenmez ve hidroksil radikali üreten reaksiyonlara katılmaz (36). Hücre membranı ile temas ettiğinde, fosfolipid tabakanın dış yüzeyine tutunan melatonin, radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları detoksifiye eder ve böylece hücre membranını korur.

Melatonin varlığında, mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan O_2^- , H_2O_2 ve OH^- gibi radikallerin üretimi de azalmaktadır (43). Hücrenin nükleusuna kadar ulaşarak genomdaki reseptörleri etkileyerek katalaz (CAT), SOD, Glutasyon Peroksidaz (GPx), Glutasyon Redüktaz (GRx) ve α -Glutamilcysteine Sentetaz (GCS) gibi antioksidan enzim sistemlerinin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini arttıran uyarıcı etki göstererek hücreyi oksidatif hasardan korur (43).

Sonuç olarak bu çalışmada; ekzojen melatonin verilmesinin, akut pankreatitli deneklerde hastalığın fizyopatolojisinde önemli rol oynayan antioksidan enzimlerin üzerine etki etmemekle birlikte lipid peroksidasyon ürünlerinden MDA düzeylerinde belirgin bir düşmenin olduğu, hastalığın biyokimyasal parametrelerinden AST, amilaz, LDH ve bilirubin düzeylerini önemli oranda düşürdüğü, dokudaki hasarın önemli histopatolojik bulguları olan PMNL infiltrasyonu, ödem, hemoraji, asiner hücre nekrozu ve apoptoziste büyük ölçüde azalma sağladığı kanaatine varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Alhan E, Kalyoncu NI, Kural BV, Erçin C. Effects of melatonin on acute necrotizing pancreatitis in rats. *Z Gastroenterol.* 2004;42:967-972.
2. Eşrefoğlu M, Gül M, Ateş B, Batçioğlu K, Selimoğlu MA. Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. *World J Gastroenterol.* 2006;12:259-264.
3. Beger HG, Rau BM. Severe acute pancreatitis: Clinical course and management. *World J Gastroenterol.* 2007;13:5043-5051.
4. Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. *Lancet.* 2008;371:143-152.
5. Banks PA, Freeman ML: Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:2379-2400.
6. Bülbüller N, Doğru O, Umaç H, Gürsu F, Akpolat N. The effects of melatonin and pentoxifylline on L-arginine induced acute pancreatitis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2005;11:108-114.
7. Chiasson, R.B.: Laboratory Anatomy of the White Rat, 4.Edition, 1980,55.
8. Skandalakis LJ, Skandalakis JE, Gray SW. Anatomy of the pancreas: Acute pancreatitis. Experimental and clinical aspects of pathogenesis end management. 1988; 207-226
9. Sayek İ. Temel Cerrahi 3.Baskı 2004 s.: 1401-1416.
10. Moynihan B. Acute Pancreatitis. *Ann Surg.* 1925;81:132-142
11. Bollen TL, van Santvoort HC, Besselink MG, et al; Dutch Acute Pancreatitis Study Group. The Atlanta Classification of acute pancreatitis revisited. *Br J Surg.* 2008;95:6-21.
12. Wysocki AP, Carter CR. Acute pancreatitis. *Surgery.* 2007; 25:49-56
13. Schwartz, Textbook, Principles of Surgery, 1999, 7th Edition; Vol:2: 1467 -1499.
14. DiMagno MJ, DiMagno EP. New advances in acute pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007;23:494-501.
15. Dembiński A, Warzecha Z, Ceranowicz P, et al. Pancreatic damage and regeneration in the course of ischemia-reperfusion induced pancreatitis in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2001;52:221-235.
16. McLoughlin MT, Mitchell RM. Sphincter of Oddi dysfunction and pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2007;13:6333-6343
17. Bhatia M, Wong FL, Cao Y, et al. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology.* 2005;5:132-144

18. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL. The pathogenesis of acute pancreatitis. The source and role of oxygen-derived free radicals in three different experimental models. *Ann Surg.* 1985;201:633-639.
19. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL. The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg.* 1984;200:405-413.
20. Schoenberg MH, Büchler M, Gaspar M, Stinner A. Oxygen free radicals in acute pancreatitis of the rat. *Gut* 1990;31:1138-1143.
21. Rau B, Poch B, Gansauge F, et al. Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage? *Ann Surg.* 2000;231:352-360.
22. Sajewicz W, Milnerowicz S, Nabzyk S. Blood plasma antioxidant defense in patients with pancreatitis. *Pancreas.* 2006;32:139-144.
23. Dabrowski A, Konturek SJ, Konturek JW, Gabryelewicz A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol.* 1999;377:1-11
24. Leja-Szpak A, Jaworek J, Tomaszewska R, et al. Melatonin precursor; L-tryptophan protects the pancreas from development of acute pancreatitis through the central site of action. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55:239-254.
25. Bulger EM, Maier RV. Antioxidants in critical illness. *Arch Surg.* 2001;136:1201-1207
26. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41:1819–1828.
27. Sokol RJ, McKim Jr JM, Goff Colby M, et al. Vitamin E reduces oxidant injury to mitochondria and the hepatotoxicity of taurochenodeoxycholic acid in the rat. *Gastroenterology* 1998;114:164– 174.
28. Aykac G, Özdemirler G. Inhibition of NADPH-induced microsomal lipid peroxidation in the livers of cholestatic rats. *Pharmacol Res* 1989; 21: 39-42.
29. Ljubuncic P, Tanne Z, Bomzon A. Evidence of a systemic phenomenon for oxidative stress in cholestatic liver disease. *Gut.* 2000;47:710-716.
30. Park BK, Chung JB, Lee JH, et al. Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2003;9:2266-2269.
31. Öztürk F. Apoptosis. *Journal of Inonu university medical faculty.* 2002;9:2
32. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet.* 1993;341:1251-1254
33. Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med.* 1993;117:1208-1214
34. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, et al. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest.* 1997;100:1853-1862.

35. Çam A, Erdoğan MF. Melatonin. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2003;56:103-112
36. Palaoğlu OS, Beşkonaklı E. Pineal gland and aging. Turkish Journal of Geriatrics. 1998;1:13-18
37. Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. J Biol Chem. 1960;235:1992-1997.
38. Kuş I, Sarsılmaz M. The morphological structure and functions of the pineal gland. T Klin J Med Sci. 2002;22:221-226
39. Arendt J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. Rev Reprod. 1998;3:13-22.
40. Tan D, Manchester LC, Reiter RJ, et al. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. Life Sci. 1999;65:2523-2529.
41. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Bubenik GA. Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. J Physiol Pharmacol. 2007;6:23-52
42. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. Endocrine. 2005;27:101-110
43. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, et al. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). J Physiol Pharmacol. 2007;58:381-405
44. Nosjean O, Ferro M, Coge F, et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. J Biol Chem. 2000;275:31311-31317.
45. Foster CE, Bianchet MA, Talalay P, Faig M, Amzel LM. Structures of mammalian cytosolic quinone reductases. Free Radic Biol Med. 2000;29:241-245
46. Janković BD, Isaković K, Petrović S. Effect of pinealectomy on immune reactions in the rat. Immunology. 1970;18:1-6.
47. Ianăș O, Olinescu R, Bădescu I. Melatonin involvement in oxidative processes. Endocrinologie. 1991;29:147-153.
48. Reiter RJ. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. Braz J Med Biol Res. 1993;26:1141-1155
49. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2003;17:273-285
50. Hoffman RA & Reiter RJ. Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. Anatomical Record. 1965;24:83-89

51. Warzecha Z, Dembinski A, Ceranowicz P, et al. Immunohistochemical expression of FGF-2, PDGF_A, VEGF and TGF- β RII in the pancreas in the course of ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis. *J. Physiol Pharmacol* 2004; 55:791-810
52. Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
53. Estebauer H, Cheeseen KH. In Packer C, Glazer AN, Eds. Oxygen radikals in biological systems, methods in enzymology. California: Academic Pres 1990: 407-421.
54. Beutler E. Red Blood cell metabolism: A manual of biochemical methods. In Beutler E, Ed. 2 nd Ed. New York: Grune&Stratton Inc, 1984; pp74-76.
55. Sun E, XU Hi Liu Q et al. The mechanism for the effect of selenium supplementation on immunity. *Biol Trace Elem Res* 1995; 48:231-238.
56. Cantürk NZ, Sayek İ. Cerrahi Araştırma. 2005 s:389-401
57. Hue Su K, Cuthbertson C, Christophi C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. *HPB (Oxford)*. 2006;8:264-286.
58. Walker NI. Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. I. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. *Am J Pathol*. 1987;126:439-451.
59. Demircan O, Sönmez H, Ersöz C, Atay A. Acute Pancreatitis by ligation of common bile and pancreatic duct. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 1997;3:175-180
60. Lerch MM, Saluja AK, Dawra R, Ramaraò P, Saluja M, Steer ML. Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells. *Gastroenterology*. 1992;103:205-213.
61. Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286:G189-196
62. Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol*. 1995;269:C1295-1304.
63. Jaworek J, Konturek SJ, Tomaszewska R, et al. The circadian rhythm of melatonin modulates the severity of caerulein-induced pancreatitis in the rat. *J Pineal Res*. 2004;37:161-170.
64. Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, et al. Ischemia-reperfusion injury on the pancreas in rats: identification of acinar cell apoptosis. *J Surg Res*. 1997;71:127-136.
65. Muñoz-Casares FC, Padillo FJ, Briceño J, et al. Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *J Pineal Res*. 2006;40:195-203.

66. Jaworek J, Brzozowski T, Konturek SJ. Melatonin as an organoprotector in the stomach and the pancreas. *J Pineal Res.* 2005;38:73-83
67. Brzozowski T, Zwirska-Korczala K, Konturek PC, et al. Role of circadian rhythm and endogenous melatonin in pathogenesis of acute gastric bleeding erosions induced by stress. *J Physiol Pharmacol.* 2007;6:53-64.
68. Jaworek J, Nawrot-Porabka K, Leja-Szpak A, et al. Melatonin as modulator of pancreatic enzyme secretion and pancreatoprotector. *J Physiol Pharmacol.* 2007;6:65-80
69. Matull WR, Pereira SP, O'Donohue JW. Biochemical markers of acute pancreatitis. *J Clin Pathol.* 2006;59:340-344.
70. Jaworek J, Nawrot K, Konturek SJ, Leja-Szpak A, Thor P, Pawlik WW. Melatonin and its precursor, L-tryptophan: influence on pancreatic amylase secretion in vivo and in vitro. *J Pineal Res.* 2004;36:155-164.
71. Szabolcs A, Reiter RJ, Letoha T, et al. Effect of melatonin on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol.* 2006;12:251-258.
72. Chen HM, Chen JC, Ng CJ, Chiu DF, Chen MF. Melatonin reduces pancreatic prostaglandins production and protects against caerulein-induced pancreatitis in rats. *J Pineal Res.* 2006;40:34-39.
73. Weber H, Merkord J, Jonas L, et al. Oxygen radical generation and acute pancreatitis: effects of dibutyltin dichloride/ethanol and ethanol on rat pancreas. *Pancreas.* 1995;11:382-388.