



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2016; 30 (3): 221 - 227
<http://www.fusabil.org>

Dilek ATEŞSAHİN¹
Songül ÇERİBAŞI²
Ahmet ATEŞSAHİN³

¹ Fırat Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Elazığ, TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Patoloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

³ Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Farmakoloji ve Toksikoloji
Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

2,3,7,8- Tetraklorodibenzo-*p*-dioksin ile Rat Beyin ve Kalp Dokusunda Oluşturulan Toksikite Üzerine Melatoninin Etkileri*

Bu çalışmada ratlarda subakut 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD)'in beyin ve kalp dokusu üzerine toksik etkileri ve bu etkilere karşı melatoninin koruyuculuğu araştırıldı.

Çalışmada 230-250 g ağırlığında 28 adet Sprague-Dawley ırkı erkek rat kullanıldı ve her grupta 7 adet hayvan olacak şekilde ayrıldı. Çalışma süresi 30 gün olarak belirlendi. Hayvanlar kontrol grubu, melatonin grubu (5 mg/kg melatonin periton içi yolla verildi), TCDD grubu (500 ng/kg TCDD gavajla verildi) ve TCDD+melatonin grubu (eş zamanlı 5 mg/kg melatonin periton içi yolla ve 500 ng/kg TCDD gavajla verildi) olarak dört gruba ayrıldı. Son ilaç uygulamasından 24 saat sonra ratlar dekapite edilerek biyokimyasal analizler için beyin ve kalp dokuları alındı. Dokuların malondialdehit (MDA) ve redukte glutatyon (GSH) düzeyleri ile katalaz (CAT) aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kalp dokusu ayrıca histopatolojik olarak incelendi.

Beyin ve kalp dokusu MDA düzeylerinin TCDD gruplarında arttığı ($P<0.05$) ve TCDD+melatonin grubunda eş zamanlı melatonin uygulamasının bu değeri azalttığı belirlendi. Hem beyin hem de kalp dokusu GSH düzeylerinin kontrol gruplarıyla kıyaslandığında TCDD gruplarında azaldığı, TCDD+melatonin grubunda melatonin uygulamasının GSH düzeylerinde istatistiksel bir fark sağlamadığı gözlemlendi ($P>0.05$). Beyin ve kalp dokusu CAT aktivitelerinde ise tüm gruplarda değişiklik görülmedi ($P>0.05$). Ayrıca TCDD'nin kalp dokusunda histopatolojik değişimlere neden olduğu ve TCDD+melatonin grubunda melatoninin bu değişimleri azalttığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma TCDD'nin serbest radikal oluşumunu artırarak beyin ve kalp dokusunda toksisiteye neden olduğunu, buna karşılık melatoninin oluşan oksidatif ve histopatolojik hasarlarda iyileşmeler sağladığını açıkça göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Dioksin, oksidatif stres, antioksidan, melatonin, rat

The Effects of Melatonin on 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin Induced Toxicity in Rat Brain and Heart

In this study, the toxic effects of subacute 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on brain and heart tissues and the protection of melatonin against these effects in rats were investigated.

A total of 28 male Sprague-Dawley rats weighing between 230-250 g were used in the present study and divided into groups as seven rats in each group. The experimental period was 30 days. Animals were divided into four groups, as control group, melatonin group (5 mg/kg dose of melatonin was given), TCDD group (500 ng/kg TCDD was given), TCDD+melatonin group (500 ng/kg TCDD and 5 mg/kg melatonin were given simultaneously). After 24 hours of the last drug application, rats were decapitated and their brain and heart tissues were removed for biochemical analysis. The tissue malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) levels and catalase (CAT) activities were measured spectrophotometrically. Heart tissue was also examined histopathologically.

MDA levels of brain and heart tissues were determined to increase in TCDD groups ($P<0.05$) and simultaneous application of melatonin to reduce this value in TCDD+melatonin group. GSH levels in both brain and heart tissues were observed to be decreased in TCDD groups compared to control groups while melatonin administration did not provide statistical difference in TCDD+melatonin group ($P>0.05$). No change in CAT activities was observed in either brain and heart tissues in all groups ($P>0.05$). In addition TCDD was observed to cause histopathological changes in heart tissue and melatonin to reduce these changes in TCDD+melatonin group.

Consequently, this study clearly indicated that TCDD induced toxicity by increasing the formation of free radicals in brain and heart tissues, while melatonin might provide improvements on oxidative and histopathological damage.

Key words: Dioxin, oxidative stress, antioxidant, melatonin, rat

Geliş Tarihi : 29.03.2016
Kabul Tarihi : 22.07.2016

Yazışma Adresi Correspondence

Dilek ATEŞSAHİN
Fırat Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Elazığ - TÜRKİYE

dilekatessahin@gmail.com

* Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Projeleri (FÜBAP) tarafından 1840 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Giriş

TCDD çevrede uzun süre kalıcılığı olan, yapısal olarak aynı mekanizmayla toksisite oluşturup canlılarda biyolojik olarak benzer etkiler gösterebilen geniş bir ailenin prototipidir. Bu bileşikler gerçekte herhangi bir amaç için üretilmeyip, endüstriyel üretim ve başta atık yakma gibi yanma işlemlerinin yan ürünü olarak doğaya salınırlar (1). TCDD'nin insan ve hayvanlarda başta immunotoksosite, kardiyotoksosite ve kanser yapıcı etkileri olmak üzere çok önemli toksik etkiler gösterdiği bilinmektedir (2). Ayrıca TCDD'nin özellikle subkronik ve kronik uygulamalarda beyin dokusunda önemli düzeylerde reaktif oksijen türleri, lipit peroksit ürünleri ile antioksidan enzim sistemlerini etkilediği bildirilmiştir (3). Yapılan çalışmalarda TCDD'nin toksisitesini ve oksidatif stres üzerine olan etkilerini özel bir protein olan aril hidrokarbon reseptörü (AhR) aracılığıyla oluşturduğu gösterilmiştir (4, 5).

TCDD toksisitesinde oksidatif stres önemli bir unsur olup TCDD'ye maruz kalma sonrasında reaktif oksijen türlerinin üretimi, lipit peroksidasyonu ve genellikle DNA ile membran hasarlarında artışlar gözlenmiştir (6). Ayrıca yapılan çalışmalarda TCDD'nin rat karaciğerinde parankim dejenerasyonu, sinüzoidal genişleme ve lipit birikimi gibi birçok patolojik hasara yol açtığı görülmüştür (5, 7). Bunların üzerine birçok antioksidanın TCDD toksisitesine karşı koruyucu olup olmayacağı araştırılmış ve C57BL/6J fareleriyle yapılan bir çalışmada Vitamin A ve E'nin TCDD'nin neden olduğu akut toksisiteye karşı oksidatif stres parametrelerinde iyileşmeler sağladığı görülmüştür (8). Ratlarla yapılan başka bir çalışmada ise antioksidan bütildihidroksianisol'ün TCDD'nin letal dozlarına karşı kısmen koruma sağladığı ve lipit peroksidasyonu baskıladığı gösterilmiştir (9). Ayrıca likopen ve ellagik asidin lipit peroksidasyonu yok ederek ve antioksidan enzim aktivitelerini artırarak TCDD kaynaklı testis ve sperm toksisitesine karşı etki gösterdikleri bildirilmiştir (10).

Melatonin (*N*-asetil-5-metoksitriptamin) pineal bezden salgılanan, güçlü bir serbest radikal süpürücü ve antioksidandır (11). Melatonin triptofandan üretilmiş ve pleiotropik aktivitesi olan bir moleküldür ve klasik antioksidanlardan farklı, kendine özgü birçok özellikleri bulunmaktadır. Bu özellikler melatoninin serbest radikallerle birlikte kaskad reaksiyonlarını ve oksidatif stresi hafifletme kapasitesini kapsamaktadır. Ayrıca bu özellikler melatoninin, organizmaları katastrofik oksidatif stresten koruyan güçlü bir endojen antioksidan yapmaktadır (12). Bunların yanısıra melatoninin uyku-uyanıklık durumu ile sirkadiyen ve mevsimsel ritmi düzenler. İmmün düzenleyici ve hücre koruyucu ajan olarak görev yapar (13).

Bu çalışmada, dioksinler grubunun en toksik bileşiği olarak bilinen TCDD'nin ratlarda beyin ve kalp dokusu üzerine etkilerinin belirlenmesi ve oluşacak toksisiteye karşı endojen bir hormon olan melatoninin dışarıdan yüksek dozlarda verilmesiyle bu toksik etkilere karşı

muhtemel koruyucu etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada kullanılan Sprague-Dawley ırkı erkek ratlar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (FÜDAM) temin edildi. Çalışmalar sırasında ratlar standart şartlarda (sabit ve ısı havalandırmalı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olmak üzere) bir kafeste en fazla 4 hayvan olacak şekilde kafeslerde barındırıldı. Ratların beslenmesinde standart rat yemi ve içme suyu kullanıldı.

Çalışma için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu onayı (Toplantı tarihi 10.06.2009; Toplantı Sayısı: 22; Karar No: 42) alınarak; çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı.

Ortalama ağırlıkları 230-250 g olan 8 haftalık 28 adet rat her grupta 7 adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı ve çalışma süresi 30 gün olarak belirlendi. Çalışmada kullanılan TCDD'nin dozu Sato ve ark. (14) ile Sakin ve ark. (15) tarafından ve melatoninin dozu ise Ateşşahin ve ark. (11) tarafından daha önce yapılan çalışmalara göre belirlendi. Deneme grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

1.Grup (Kontrol grubu): TCDD'nin çözücüsü olan 0.5 mL mısır yağı gavajla ve melatoninin çözücüsü 0.5 mL sıvı (9 kısım fizyolojik serum + 1 kısım etil alkol) periton içi yolla verildi.

2.Grup (Melatonin grubu): 5 mg/kg dozunda melatonin periton içi yolla verildi.

3.Grup (TCDD+melatonin grubu): 500 ng/kg dozunda TCDD gavajla verildi

4.Grup (TCDD+melatonin grubu): 500 ng/kg dozunda TCDD gavajla ve eş zamanlı olarak 5 mg/kg dozunda melatonin periton içi yolla uygulandı.

Son ilaç uygulamasından 24 saat sonra ratlar dekapite edilerek biyokimyasal analizler için beyin ve kalp dokuları çıkarıldı ve analizler yapıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Kalp dokusunun bir kısmı ise %10'luk formaldehit içerisine konularak, histopatolojik analizler için ayrıldı.

Dokular tartılıp cam tüplere konulduktan sonra üzerlerine 1/10 (g/v) oranında dilüsyon olacak şekilde %1.15'lik potasyum klorür (KCl) ilave edildi ve soğuklukları muhafaza edilerek cam-teflon homojenizatörde 16.000 devir/dakika hızda 3 dakika homojenize edildi. Hazırlanan homojenatlarda doku MDA tayinleri yapıldı. Geri kalan homojenat +4 °C'de 45 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Süpernatantlarda ise redükte GSH düzeyleri ile CAT aktivite ölçümleri ve protein tayinleri yapıldı.

Doku MDA düzeylerinin tayini spektrofotometrik olarak Ohkawa ve ark. (16) tarafından önerilen metoda

göre yapıldı. Standart (1,1,3,3 tetraetoksiopropan): %50 Etanol içerisinde hazırlandı. Dokuların redükte GSH düzeyleri Ellman (17) tarafından önerilen ditiyonitrobenzoik asit geri çevirim metodu olarak tanımlanan ve CAT enzim aktivitesi Aebi (18) tarafından tarif edilen yöntemlere göre ölçüldü. Süpernatantlardaki protein miktarı tayinleri ise Lowry ve ark. (19) tarafından tarif edilen yöntemlere göre ölçüldü.

Histopatolojik muayeneler için kalpten alınan doku örnekleri, %10'luk tamponlu nötral formalin solüsyonunda tespit edildikten sonra parafin blokları hazırlandı. Bloklar 5 µm kalınlığında kesilerek Hematoksin-Eosin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi (20). Dokularda tespit edilen histopatolojik değişimler lezyon yok (0), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) lezyon şeklinde skorlandı. Skorumla sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildi.

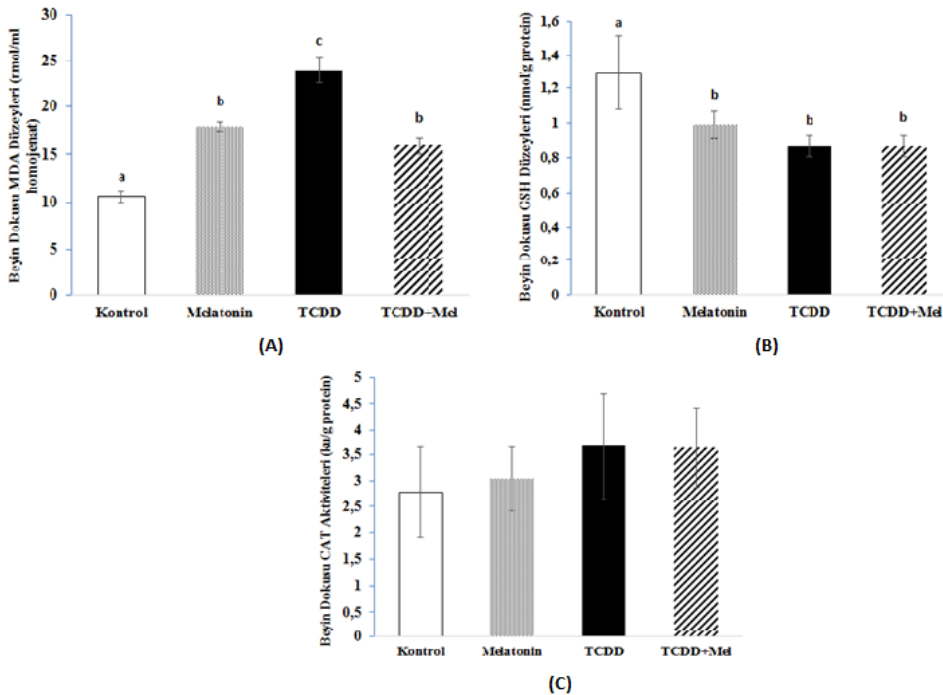
Çalışmadan elde edilen veriler "SPSS for Windows 15" paket programı kullanılarak değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırılma, normallik testinden sonra parametrik One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) ve Post hoc Tukey testi ile yapıldı. Sonuçlar ortalama ± Standart hata olarak ifade edildi ve $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

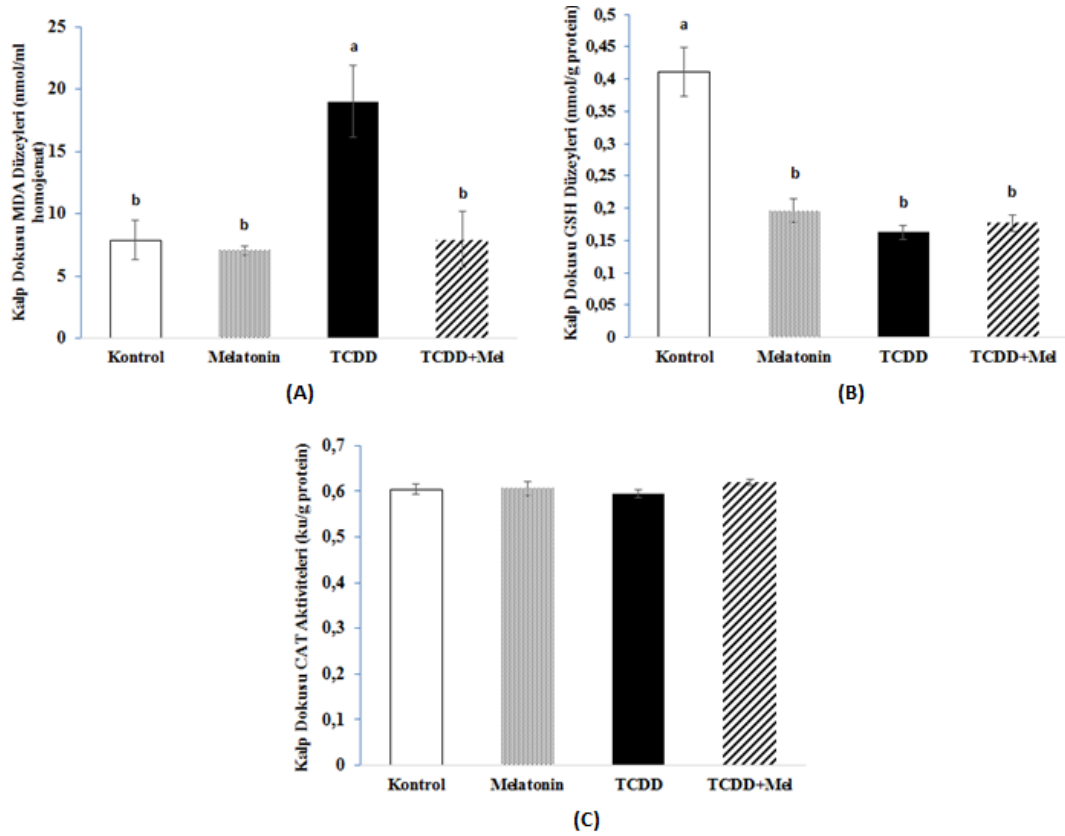
Beyin dokusu: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TCDD grubunda MDA düzeylerinin istatistiksel olarak yükseldiği (sırasıyla 10.58 ± 0.61 , 23.97 ± 1.44 nmol/mL

homojenat), TCDD+melatonin grubunda ise bu değer (15.95±0.87 nmol/mL homojenat) düştüğü görülmektedir ($P < 0.05$) (Şekil 1A). Çalışmada GSH düzeylerinin TCDD uygulamasıyla kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düştüğü (sırasıyla 1.30 ± 0.22 , 0.87 ± 0.04 nmol/g protein), buna karşın TCDD ile eş zamanlı melatonin uygulamasının anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı belirlendi ($P > 0.05$) (Şekil 1B). Beyin dokusu CAT aktivitelerinin ise kontrol, melatonin, TCDD, TCDD+melatonin gruplarında sırasıyla 2.78 ± 0.87 , 3.03 ± 0.62 , 3.66 ± 1.32 , 3.64 ± 0.78 ku/g protein olarak ancak gruplar arası farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü ($P > 0.05$) (Şekil 1C).

Kalp dokusu: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında TCDD grubunda MDA düzeylerinin istatistiksel olarak yükseldiği (sırasıyla 7.85 ± 1.58 , 19.02 ± 2.87 nmol/mL homojenat) görüldü. TCDD+melatonin grubunda bu değer 7.9 ± 2.25 nmol/mL homojenat olduğu görülmektedir ($P < 0.05$) (Şekil 2A). Çalışmada GSH düzeylerinin TCDD uygulamasıyla kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düştüğü (sırasıyla 0.41 ± 0.03 , 0.16 ± 0.01) gözlemlendi ($P < 0.05$). Buna karşın TCDD ile eş zamanlı melatonin uygulamasının anlamlı değişiklik oluşturmadığı görüldü ($P > 0.05$) (Şekil 2B). CAT aktiviteleri kontrol, melatonin, TCDD ve TCDD+melatonin gruplarında sırasıyla 0.60 ± 0.012 ; 0.60 ± 0.015 ; 0.59 ± 0.009 ve 0.62 ± 0.007 ku/g protein olup, gruplar arası fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($P > 0.05$) (Şekil 2C).

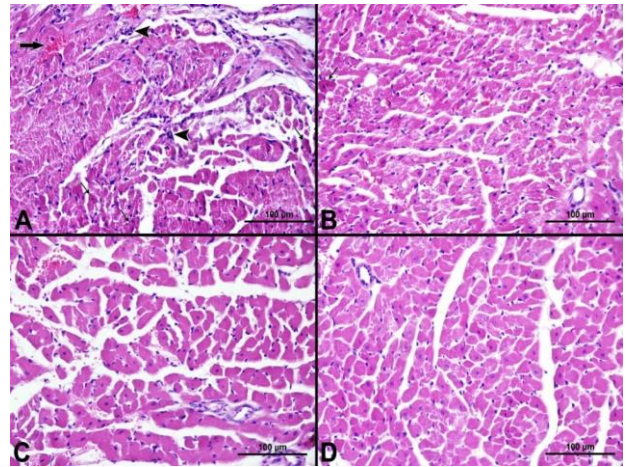


Şekil 1. Tüm grupların beyin dokusuna ait MDA Düzeyleri (A), GSH Düzeyleri (B), CAT Aktiviteleri (C). Veriler ortalama (Ort) ± Standart Hata (SH) olarak ifade edilmiştir, $P < 0.05$. a,b,c: Farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir. TCDD+Mel- TCDD+Melatonin.



Şekil 2. Tüm grupların kalp dokusuna ait MDA Düzeyleri (A), GSH Düzeyleri (B), CAT Aktiviteleri (C). Veriler ortalama (Ort) ± Standart Hata (SH) olarak ifade edilmiştir, $P < 0.05$. a,b,c: Farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir. TCDD+Mel- TCDD+Melatonin.

Kalp dokusunda meydana gelen lezyonlar Tablo 1'de özetlendi. Tek başına TCDD uygulanan grupta şiddetli miyofibriller dejenerasyon, nekrotik değişimler ve az sayıda perivasküler lenfosit ve makrofaj infiltrasyonları gözlemlendi. Bu değişimlere ek olarak intersitisyel ödem ile birlikte kapillar damarlarda konjesyon tespit edildi (Şekil 3A). TCDD ile birlikte melatonin uygulanan grupta intersitisyel ödem ve perivasküler hücre infiltrasyonu TCDD grubuna göre daha hafif şiddette, miyofibriller dejenerasyonu ise TCDD grubu ile benzer görünümde olduğu dikkati çekti (Şekil 3B). Ancak bu grupta miyofibrillerdeki nekrotik değişimlerin azaldığı saptandı. Sadece melatonin uygulanan grupta ise belirgin intersitisyel ödem ile birlikte dejeneratif değişimlerin oldukça hafif şiddette olduğu gözlemlendi (Şekil 3C). Kontrol grubunda kalbin normal histolojik görünümünde olduğu saptandı (Şekil 3D).



Şekil 3. A. TCDD grubunda miyofibrillerde nekroz (küçük oklar), dejenerasyon, mononükleer hücre infiltrasyonları (ok başları), intersitisyel ödem ve konjesyon (büyük ok). B. TCDD+Melatonin grubunda miyositlerde karyopiknoz ile karakterize nekrotik değişim (ok) ve dejenerasyon. C. Melatonin grubunda belirgin intersitisyel ödem. D. Kontrol grubunda kalbin histolojik görünümü (H&E).

Tablo 1. Ratların kalp dokularında gözlenen histopatolojik bulgular

LEZYONLAR	GRUPLAR					
	TCDD	TCDD+Melatonin	Melatonin	Kontrol	SH	P
İntersitzyel ödem	1.57 ± 0.20 ^a	0.86 ± 0.14 ^b	0.63 ± 0.20 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	0.13	0.001
Miyofibriler dejenerasyon	1.29 ± 0.18 ^a	1.00 ± 0.21 ^a	0.43 ± 0.20 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.13	0.001
Perivasküler hücre infiltrasyonu	1.14 ± 0.14 ^a	0.67 ± 0.20 ^b	0.19 ± 0.18 ^{bc}	0.00 ± 0.00 ^c	0.11	0.001
Kapillar damarlarda konjesyon	1.86 ± 0.14 ^a	1.71 ± 0.18 ^a	0.86 ± 0.26 ^b	0.00 ± 0.00 ^c	0.17	0.001

Veriler ortalama (Ort) ± Standart Hata (SH) olarak ifade edilmiştir, P<0.05. a,b,c: Farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar önemlidir.

Tartışma

Çevresel bir kirletici olan ve canlılar için toksisitesi iyi bilinen TCDD ile başta kemiriciler olmak üzere birçok hayvan türünde toksisite çalışmaları yapılmış ve özellikle sinir sistemi (21, 22), kardiyovasküler sistem (23-26) üreme organları (10, 27, 28) endokrin sistem (29) ve diğer birçok sistemde belirgin toksik etkiler meydana getirdiği bildirilmiştir. Ratlarda yapılan çalışmalarda TCDD'nin subakut ve subkronik toksik etkilerini 46 ng/kg dozlarında gösterdiği bildirilmektedir (3). Deneysel çalışmalarda TCDD'nin akut toksisitesi aşırı kilo kaybı, timus bezinde atrofi, hepatik hipertrofi gibi durumlarla birlikte gelişen Wasting sendromu ile ortaya konmuştur (14). Bu çalışmada TCDD'nin dozu beyin ve kalpte belirgin bir oksidatif stres oluşturmak amacıyla 500 ng/kg gibi yüksek bir doz olarak belirlenmiş ve 30 gün süreyle subakut bir toksisite oluşturulmaya çalışılmıştır.

Oksidatif stres, oksidan-antioksidan dengenin oksidantlara doğru kayması sonucu görülür. Akut yüksek doz TCDD uygulaması sonucu çeşitli doku ve türlerde oksidatif stresin görüldüğü iyi bilinmektedir. Laboratuvar hayvanlarında TCDD maruziyeti sonucu oluşan oksidatif stresin ROS, lipit peroksidasyon ve DNA hasarında artışa neden olduğu gözlenmiştir (22, 30). Kopf ve ark. (26)'nın yaptığı çalışmada TCDD'nin subkronik uygulanması sonucu oksidatif stres parametreleri, kan basıncı ve kalp ağırlığında artışlara neden olduğu gösterilmiştir. Laboratuvar hayvanlarına TCDD uygulanmasının birçok dokuda lipit peroksidasyonun artışıyla beraber oksidatif strese neden olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (30, 31).

Çalışmalar TCDD detoksifikasyonunda antioksidanların etkisi üzerinde durmakta ve AhR agonistlerinin ise antioksidan kullanmaksızın tek başlarına yeterli etki göstermediklerini bildirmektedir (6). Antioksidanlar genellikle ksenobiyotiklere cevap şeklinde veya çeşitli hastalık sonucu oluşan oksidatif strese karşı koruyucu amaçlı kullanılmaktadır (21). Bu hedef doğrultusunda yapılan birçok çalışmada TCDD'nin meydana getirmiş olduğu hasarlara ve ROS'a karşı çeşitli antioksidanlar kullanılmıştır. Bu çalışmada ise ratlara TCDD uygulaması sonrasında beyin ve kalp dokusunda oluşacak hasarlara karşı melatonin

uygulanarak, iyileşmeler sağlayıp sağlamayacağını belirlenmesi amaçlanmıştır. Melatonin etkili bir biçimde çeşitli reaktif oksijen ve nitrojen türleri ile etkileşime giren ve antioksidan enzimlerle prooksidan enzimleri düzenleyen güçlü bir antioksidandır (13).

Lipit peroksidasyonun en önemli göstergelerinden olan MDA düzeylerinin özellikle serebral korteks ve hipokampusta TCDD tarafından önemli düzeylerde artırıldığı ve beyin diğer bölgelerinin ise fazla etkilenmediği belirtilmiştir (3). Bir başka çalışmada ise 13 hafta boyunca farklı dozlarda uygulanan TCDD'nin B6C3F1 dişi ratlarda, doza bağlı şekilde sitokrom c azalmasıyla süperoksit anyon radikal üretiminde, lipit peroksidasyonunda ve DNA çift zincir kırılmalarında artışa neden olduğu görülmüştür (30). Sakin ve ark. (15)'nin yaptıkları çalışmada ise ratlara uygulanan TCDD'nin doza bağlı olarak kalp, beyin, karaciğer ve böbrek dokularında MDA'yı artırdığı ve likopenin de bu etkiyi hafiflettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada 500 ng/kg dozda TCDD'nin 30 gün süreyle uygulanması, tüm beyin ve kalp dokusunda önemli derecede MDA düzeylerinde artışlara neden olmuş ve meydana gelen MDA düzeylerindeki artışlar melatonin uygulamasıyla azaltılmıştır. Şahna ve ark. (32)'nin yaptığı bir çalışmada melatoninin fizyolojik ve farmakolojik konsantrasyonlarının miyokardiyal doksorubisin toksisitesine karşı koruyuculuk sağladığı, melatonin verilen ratlarda MDA seviyesinin kontrole yakın olduğu ve kalpteki morfolojik değişikliklerde iyileşmeler sağladığı görülmüştür. Önceki çalışmalara paralel olarak bu çalışmada TCDD uygulamalarının muhtemelen hücre membranlarında serbest radikal oluşumunu artırarak dokularda MDA düzeyinde artışlara yol açtığı ve lipit peroksidasyonuna neden olduğu, melatonin uygulamasıyla da yükselen MDA düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir.

GSH hayvan hücrelerinde en çok bulunan hücre içi antioksidanlardan biridir ve endojen ROS ile eksojen oksidatif hasarı detoksifiye eder (33). GSH düzeylerinin dokularda azalması birçok patolojik olayın varlığına işaret etmektedir (34). Ayrıca GSH düzeyindeki azalma, vitamin C'nin yenilenmesi ve okside formdaki vitamin E'nin azalması üzerindeki rolünden dolayı da antioksidan sistem üzerinde etkilidir (35). GSH düzeylerinin

ksenobiyotiklere karşı verdiği tepki bazen azalarak bazen de yükselerek kendini gösterebilmektedir. Özellikle çok düşük miktarlarda TCDD'ye maruz kalan farelerde GSH düzeyinin arttığı, ancak yüksek doz TCDD uygulamasına karşı ise tükenmeye bağlı olarak miktarında azalmalar görüldüğü bildirilmektedir (30). Subkronik TCDD uygulamasının beyinde GSH düzeyini azalttığı, ellagik asidin GSH seviyesini yükselttiği ancak vitamin E süksinatın beyin hiçbir bölgesinde GSH seviyesi üzerine etkili olmadığı gözlenmiştir (21). Bu çalışmada ise TCDD'nin yüksek dozlarda uygulanmasına bağlı olarak GSH düzeyinin her iki dokunun kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 1B, 2B), ancak melatonin uygulaması anlamlı bir yükselme sağlayamamıştır.

Aerobik hücrelerin peroksisomlarında bulunan ve hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştüren CAT, enzimatik antioksidan sisteminin önemli bir parçası olarak kabul edilmektedir (36). Bazı çalışmalarda TCDD uygulaması CAT aktivitesini değiştirmişken, bazı çalışmalarda anlamlı değişiklik oluşturmamıştır. Günlük 10 ng/kg dozunda uygulanan TCDD'nin beyin hipokampus ve serebral korteks bölgelerinde CAT aktivitesinde yükselmeye neden olduğu ancak beyin sapında hiçbir değişikliğe neden olmadığı, 22 ile 46 ng/kg dozlarında uygulanan TCDD'nin ise CAT enzim aktivitesini bu bölgelerde baskıladığı görülmüştür (22). Bir başka çalışmada ise TCDD uygulamasının kalp dokusunda CAT aktivitesinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir (37). Ratlarla yapılan bir çalışmada 13 hafta süre ile farklı dozlarda TCDD ve antioksidan olarak likopen uygulanmıştır. Kalp dokusu CAT aktivitesinde gruplar arası fark gözlenmezken; karaciğer, böbrek ve beyin dokularında TCDD uygulamalarının katalaz aktivitelerinde önemli azalmalara neden olduğu gözlenmiştir (15). Bu çalışmada ise tüm gruplar karşılaştırıldığında beyin ve kalp dokusunun her

ikisinde de CAT aktivitesinde herhangi bir farklılığın olmadığı görülmüştür (Şekil 1C, 2C).

Toksikolojik çalışmalarda dioksinlerin rat ve farelerde kardiyovasküler etkilerinin olduğu, ayrıca fetal memeli kalbinin ise TCDD indüklü teratojenitede hedef organ olduğu gösterilmiştir. TCDD ya da PCB-126'nın veya dioksin benzeri PCB'lerin doza bağlı olarak kardiyomiopati ve kronik aktif artrit gibi dejeneratif kardiyovasküler lezyonların görülme sıklığını artırdığı bildirilmiştir (38). Benzer şekilde TCDD'nin kalp dokusunda nekroz ve kanamaya neden olduğu güçlü bir antioksidan olan protokateşuik asit uygulamasının kısmen koruyuculuk sağladığı belirtilmiştir (39). Ratlarda okratoksin ile oluşturulan kalp ve akciğer hasarında melatoninin histopatolojik olarak iyileşmeler sağladığı gösterilmiştir (40). Bir başka çalışmada ise ratlarda kurşunun böbrek ve karaciğer dokusunda neden olduğu hasara karşı melatoninin koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir. (41). Bu çalışmada TCDD uygulamasının kalp dokusunda intersitisyel ödem, konjesyon, perivasküler hücre infiltrasyonu ve çeşitli nekrotik değişiklikler gibi patolojik hasarlara yol açtığı ve melatoninin bu hasarları hafiflettiği tespit edilmiştir (Şekil 3, Tablo 1). Sunulan çalışma bulguları ile anılan çalışma sonuçlarının benzer olduğu saptanmıştır; ek olarak bu çalışmada melatoninin TCDD'nin kardiyotoksik etkisini azalttığı ortaya konmuştur.

Bu çalışmada TCDD'nin beyin ve kalp dokusunda oksidatif ve histopatolojik hasarlara neden olduğu, güçlü bir antioksidan olan melatoninin TCDD toksisitesine karşı koruyucu olduğu ve oluşan hasarları azalttığı görülmüştür. Melatoninin bu olumlu etkilerini serbest radikal süpürücü ve antioksidan özellikleriyle gösterebildiği düşünülmektedir. Sonuç olarak çeşitli ksenobiyotikler tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı melatonin gibi antioksidan maddelerin kullanımı önerilebilir.

Kaynaklar

- White SS, Birnbaum LS. An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology. *J Environ Sci and Heal C* 2009; 27: 197-211.
- İlhan S, Ateşşahin D, Ateşşahin A, et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced hypertension: The beneficial effects of melatonin. *Toxicol Ind Health* 2015; 31: 298-303.
- Hassoun EA, Vodhanel J, Abushaban A. The modulatory effects of ellagic acid and vitamin E succinate on TCDD-induced oxidative stress in different brain regions of rats after subchronic exposure. *J Biochem Mol Toxicol* 2004; 18: 196-203.
- Landers JP, Bunce NJ. The Ah receptor and mechanism of dioxin toxicity. *Biochem J* 1991; 276: 273-287.
- Türkez H, Yousef MI, Geyikoğlu F. Propolis protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induced toxicity in rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* 2012; 50: 2142-2148.
- Türkez H, Geyikoğlu F, Yousef MI. Modulatory effect of L-glutamine on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced liver injury in rats. *Toxicology and industrial health* 2012; 28: 663-672.
- Hung YC, Huang GS, Sava VM, et al. Protective effects of tea melanin against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity: antioxidant activity and aryl hydrocarbon receptor suppressive effect. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2006; 29: 2284-2291.
- Alsharif NZ, Hassoun EA. Protective effects of vitamin a and vitamin E succinate against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced body wasting, hepatomegaly, thymic atrophy, production of reactive oxygen species and DNA damage in C57BL/6J Mice. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2004; 95: 131-138.
- Hassan MQ, Stohs SJ, Murray WJ. Inhibition of TCDD-induced lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity and toxicity by BHA and glutathione. *Bulletin of*

- environmental contamination and toxicology 1985; 34: 787-796.
10. Sönmez M, Türk G, Çeribaşı A, Sakin F, et al. Attenuating effect of lycopene and ellagic acid on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced spermiotoxicity and testicular apoptosis. *Drug and Chemical Toxicology* 2011; 34: 347-356.
 11. Ateşşahin A, Şahna E, Türk G, et al. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res* 2006; 41: 21-27.
 12. Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, et al. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules* 2015; 20: 18886-18906.
 13. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinal DP. Melatonin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2006; 38: 313-316.
 14. Sato S, Shirakawa H, Tomita S, et al. Low-dose dioxins alter gene expression related to cholesterol biosynthesis, lipogenesis, and glucose metabolism through the aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway in mouse liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2008; 229: 10-19.
 15. Sakin F, Bulmuş FG, Servi K, et al. Protective effect of lycopene on oxidative stress induced by different doses of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in brain, liver, kidney, and heart tissue of rats. *Farmacia* 2011; 59: 462-470.
 16. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
 17. Ellman G. Tissue sulphydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70-77.
 18. Aebi H. Catalase in vitro assay methods. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
 19. Lowry OH, Rosebroug NJ, Farr, AL et al. Protein measurement with pholin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
 20. Bancroft JD, Stevens A. *Theory and practise of histological techniques*. 3rd Edition, Edinburg, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone 1990.
 21. Hassoun EA, Vodhanel J, Holden B, Abushaban, A. The effects of ellagic acid and vitamin E succinate on antioxidant enzymes activities and glutathione levels in different brain regions of rats after subchronic exposure to TCDD. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 2006; 69: 381-393.
 22. Hossoun EA, Al-Ghafri, M, Abushaban A. The role of antioxidant enzymes in TCDD-induced oxidative stress various brain regions of after subchronic exposure. *Free Radical Bio & Med* 2003; 35: 1028-1036.
 23. Kopf PG, Walker MK. Overview of developmental heart defects by dioxins, PCBs, and pesticides. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2009; 27: 276-285.
 24. Antkiewicz DS, Burns CG, Carney SA, Peterson RE, et al. Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish. *Toxicological Sciences* 2005; 84: 368-377
 25. Sarıhan ME, Parlakpınar H, Çiftçi O, et al. Protective effects of melatonin against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced cardiac injury in rats. *European Journal of Pharmacology* 2015; 762: 214-220.
 26. Kopf PG, Huwe JK, Walker MK. Hypertension, cardiac hypertrophy, and impaired vascular relaxation induced by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin are associated with increased superoxide. *Cardiovascular toxicology* 2008; 8: 181-193.
 27. Latchoumycandane C, Mathur PP. Effects of vitamin on reactive oxygen species-mediated 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity in rat testis. *J Appl Toxicol* 2002; 22: 345-351.
 28. Latchoumycandane C, Chita KC, Mathur PP. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) induces oxidative stress in the epididymis and epididymal sperm of adult rats. *Arch Toxicol* 2003; 77: 29-41.
 29. Trewin AL, Woller MJ, Wimpee BAB, et al. Short-term hormone release from adult female rat hypothalamic and pituitary explants is not altered by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J Reprod Develop* 2007; 53: 765-775.
 30. Slezak BP, Hatch GE, Devito MJ, et al. Oxidative stress in female B6C3F1 mice following acute and subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Toxicol Sci* 2000; 54: 390-398.
 31. Bulmuş FG, Sakin F, Türk G, et al. Protective effects of curcumin on antioxidant status, body weight gain, and reproductive parameters in male rats exposed to subchronic 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicological & Environmental Chemistry* 2013; 95: 1019-1029.
 32. Şahna E, Parlakpınar H, Özer, MK, et al. Melatonin protects against myocardial doxorubicin toxicity in rats: Role of physiological concentrations. *Journal of Pineal Research* 2003; 35: 257-261.
 33. Kidd PM. Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Altern Med Rev* 1997; 2: 155-176.
 34. Anundi I, Hogberg J, Stead AH. Glutathione depletion in isolated hepatocytes: Its relations to lipid peroxidation and cell damage. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1979; 45: 45-51.
 35. Comporti M, Maellaro E, Del Bello B, et al. Glutathione depletion: Its effects on other antioxidant systems and hepatocellular damage. *Xenobiotica* 1991; 21: 1067-1076.
 36. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and cofactors. *Clin Intervent in Aging* 2007; 2: 219-236.
 37. Hermansky SJ, Holcslaw TL, Murray WJ. Biochemical and functional effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the heart of female rats. *Toxicology and applied pharmacology* 1988; 95: 175-184.
 38. Humblet O, Birnbaum L, Rimm E, et al. Dioxins and cardiovascular disease mortality. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 1443-1448.
 39. Çiftçi O, Dişli OM, Timurkaan N. Protective effects of protocatechuic acid on TCDD-induced oxidative and histopathological damage in the heart tissue of rats. *Toxicology and Industrial Health* 2013; 29: 806-811.
 40. Okutan H, Aydin G, Özcelik N. Protective role of melatonin in ochratoxin a toxicity in rat heart and lung. *Journal of Applied Toxicology* 2004; 24: 505-512.
 41. El-Sokkary GH, Abdel-Rahman GH, Kamel ES. Melatonin protects against lead-induced hepatic and renal toxicity in male rats. *Toxicology* 2005; 213: 25-33.