

Etanolle Oluşan Mide Mukoza Hasarında Nitrik Oksit'in Koruyucu Etkisi

The Protective Effect of Nitric Oxide in Ethanol-Induced Gastric Mucosal Damage

Dr.Akın ÖZDEN^{*}, Dr.Uğur SUNGURTEKİN^{*}, Dr.Ayşe BİLGİHAN^{**}
Dr.Reşat ÖZERCAN^{***}, Dr.Mehmet NEŞŞAR^{*}, Dr.Nurten TÜRKÖZKAN^{***}

ÖZET: Bu çalışmada, ratlarda etanolle oluşan mide mukozal lezyonlarında nitrik oksit'in (NO) etkisi araştırıldı. Otuzaltı rat altı gruba ayrıldı: 1. Kontrol grubu, 2. kontrol+N_vNitro-L-arginin (N_vNA), 3. N_vNA + etanol, 4. etanol, 5) L-arginin+etanöl ve 6) N_vNA+L-arginin+etanöl uygulanan gruplar. Grup 5'te ekzojen olarak etanolle birlikte NO prekürsörü olan L-arginin'in verilmesi; grup 3 ve 4'e göre mide mukozasında oluşan histopatolojik hasarı ve malondialdehid (MDA) düzeyini anlamlı olarak azalttı. N_vNA ile NO'in inhibe edildiği grup 3'te bu hasarın etanol grubundan daha fazla olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar NO prekürsörü L-arginin'in etanolle oluşan mide mukozal hasarında koruyucu rolünü göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Mide mukozal lezyonu, Nitrik oksit

SUMMARY: In this study, the effect of nitric oxide (NO) was investigated on ethanol induced gastric mucosal lesions in rats. A total of 36 rats were allocated to six groups: These were 1. Control group, 2. Control+N_vNitro-L-arginine (N_vNA), 3. N_vNA+ethanol, 4. ethanol, 5. L-arginine+ethanol and 6. N_vNA+L-arginine+ethanol groups. It has been observed that administration of L-arginine exogenously, which is the precursor of NO besides ethanol in group 5, significantly reduced histopathologic damage and malonyledialdehyde levels in tissue than those of groups 3 and 4. MDA levels in group 4 was lower than group 3 which NO was inhibited by administrating N_vNA. These results show the preventive role of NO in ethanol-induced gastric mucosal lesions.

Key Words: Gastric mucosal injury, Nitric oxide

Etanol tarafından oluşturulan gastrik mukozal hasar, mukozal lezyonların fizyopatolojisinin araştırılmasında sık olarak kullanılan bir çalışma modelidir.^{1,3} Etanolün mide mukozası ile

YAZIŞMA ADRESİ: Dr.Akın ÖZDEN

PK. 185, 20000
DENİZLİ

* Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Genel Cerrahi Anabilim Dalı, DENİZLİ
** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı, ANKARA
*** Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Patoloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

karşılaşmasından sonra vasküler permeabilite artışı, endotelial hücre hasarı, mikrosirküler staz ve doku nekrozu dakikalar içerisinde oluşmaktadır.^{1,2,4} Oluşan iskeminin yol açtığı doku hasarının açıklanması için öne sürülen teorilerden en popüler olanı serbest oksijen radikallerinin gelişmesidir.^{1,5} Akciğer, böbrek, barsak ve karaciğerde oluşturulan iskemik hasarlarda da benzer sonuçların alınması bunu desteklemektedir.^{6,7} Serbest oksijen radikalleri doku içine lökositlerin aşırı ekstrasvazyonuna ve infiltrasyonuna yol açmakta, bu ise oluşan hasarı artırmaktadır.⁷ Oksijen serbest radikallerinin varlığı hücre zarında lipid peroksidasyonu yolu ile yıkımı başlatmaktadır. Lipit peroksidasyonunun ölçülmesinde kullanılan kantitatif yöntemlerden birisi dokuda bu yıkımın son ürünü olan malondialdehit düzeylerinin tayin edilmesidir.^{8,9}

Sunulan çalışmamızın amacı; saf etanolün intragastrik uygulanmasıyla oluşan hasar derecesinin azaltılmasında nitrik oksit'in (NO) etkisini araştırmak ve NO inhibisyonu halinde dokuda gelişecek hasardaki değişikliği kantitatif olarak tayin etmektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada ağırlığı 180-250 gr arasında değişen her grupta n:6 rat olan toplam 36 adet

Sprague-Dawley cinsi rat kullanılmıştır. Çalışma öncesi ratlar çelik kafes içinde tutulmuş standart yem ile beslenme sağlanmıştır. Hayvanlar deney başlamadan 24 saat önceden itibaren sadece su alacak şekilde aç bırakılmıştır. Anestezi için ketamin hidroklorid 100 mg/kg intramusküler olarak uygulanmıştır. Deney esnasında mide de hasar oluşturmak amacıyla absolu etanol (%95) orogastrik tüp kullanılarak verildi. Oluşturulan gruplar şu şekildedir.

Grup 1 Kontrol Grubu: Orogastrik tüpten 1ml serum fizyolojik verildi. 90 dk bekleme süresinin sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek, mideleri çıkarıldı.

Grup 2 Kontrol + N_vNA Grubu: İntraperitoneal yolla (300 mg/kg) 2 ml N_vNA (N_v Nitro-L-arginine, SIGMA) verildi, 30 dakika sonra orogastrik tüpten 1ml serum fizyolojik verildi ve 90 dakika bekledikten sonra mide çıkarıldı.

Grup 3 Kontrol + N_vNA + Etanol Grubu: İntraperitoneal yolla (300 mg/kg) 2 ml N_vNA, 30 dakika sonra orogastrik yolla 1 ml etanol verildi. 90 dakika bekledikten sonra mide çıkarıldı.

Grup 4 Etanol Grubu: İntraperitoneal yolla 2 ml serum fizyolojik, 30 dakika sonra 1 ml orogastrik olarak etanol verildi, 90 dakika sonra mide çıkarıldı.

Grup 5 L-arginin + Etanol Grubu: İntraperitoneal yolla (300 mg/kg) 2 ml L-Arginin (SIGMA), 5 dakika sonra orogastrik olarak 1 ml etanol verildi. 90 dakika sonra mide çıkarıldı.

Grup 6 N_vNA + Etanol + L-arginin Grubu: İntraperitoneal yolla (300 mg/kg) 2 ml N_vNA, 30 dakika sonra (300 mg/kg) 2 ml L-Arginin, bundan 5 dakika sonra 1 ml etanol verildi. 90 dakika sonra mide çıkarıldı.

Tüm hayvanlarda proksimalde gastroözefageal bileşke, distalde piloru içine alacak şekilde çıkarıldıktan sonra mide longitudinal olarak açıldı. Mide piyesinin yarısı %10 formalin içerisine alındı. Histopatolojik inceleme için parafin bloklara konarak 5µ kalınlığında kesitler alındı ve Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyandı. Işık mik-

roskopunda preparatlar tek bir patolog tarafından kör olarak Lacy ve Ito'nun belirlediği kriterler esas alınarak değerlendirildi.^{2,4}

Grade 0: Gastrik mukoza hücreleri intakt ve normal şekil, lokalizasyon, görünüm ve dansitede.

Grade 1: Yüzeysel mukoza hücre hasarı (vaküol, piknotik nükleus ve lizise uğramış sitoplazma).

Grade 2: Yoğun hücre hasarı, hücrelerde kopma ve ayrılma.

Grade 3: Tüm yüzey hücrelerinde ve gastrik glandlarda hasar, parietal hücrelerde piknotik nükleus ve yapısal bozulma gösteren sitoplazma, yer yer nekroz varlığı.

Kalan kısımdan alınan mide örneği sıvı nitrojenle dondurularak alüminyum folyoya sarılıp, derin dondurucuda saklandı ve malondialdehit (MDA) tayini için kullanıldı. Dokular tartılarak yaklaşık %1.15'lik KCL solusyonu ile %10'luk doku homojenatları hazırlandı. Homojenatlarda tiyobarbitürik asit metodu ile MDA düzeyleri çalışıldı, sonuçlar nmol/g doku olarak değerlendirildi.

İstatistiksel değerlendirme: MDA değerlerinin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Grupların birbirleriyle karşılaştırılmasında ise LSD (least-significant difference) testi kullanıldı. p<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

Histopatolojik grade değerleri açısından grupların karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U testi kullanıldı, p<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

Grupların malondialdehit değerlerinin ortalaması (ortalama ± standart deviasyon) Grafik 1'de verilmiştir.

Grup 1: 52.83±21.50

Grup 2: 71.16±5.63

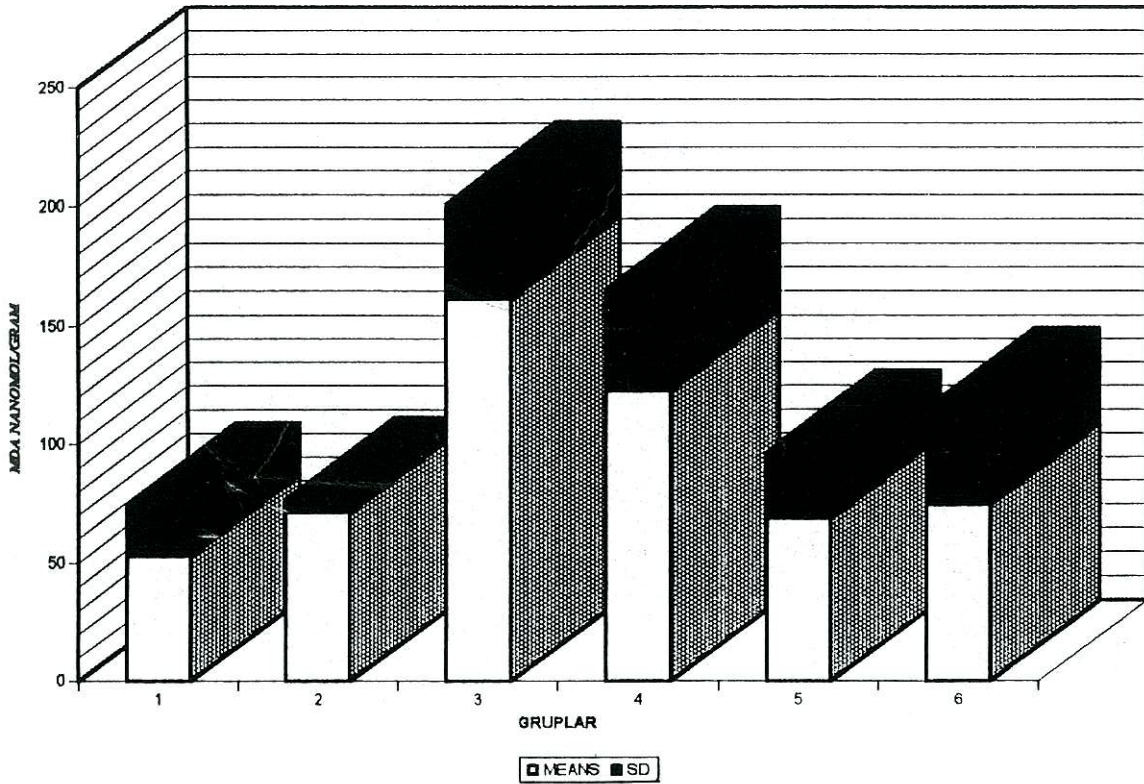
Grup 3: 161.50±39.10

Grup 4: 122.50± 42.61

Grup 5: 68.66±27.78

Grup 6: 74.16±40.59

MDA DEĞERLERİ



GRAFİK 1: Grupların malondialdehit değerleri

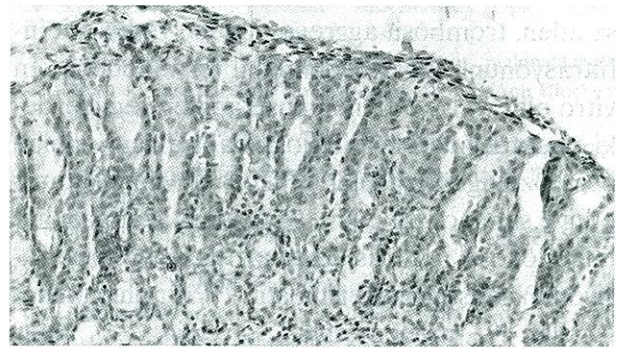
Gruplar arasında "tek yönlü varyans analizi" ile anlamlı farklılık saptandı (F:8.038, $p < 0.001$). Grupların birbiriyle karşılaştırılmasında "LSD testi" Grupların birbiriyle karşılaştırılmasında "LSD testi" kullanıldı. Grup 3 ve 4'deki MDA değerleri, diğer gruplara göre (grup 1, 3, 5, 6) anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.05$). Grup 3'deki değerler, grup 4 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Grupların histopatolojik grade değerleri Grafik 2'de gösterilmiştir.

- Grup 1: 0.66 ± 0.52
 Grup 2: 1.66 ± 0.51
 Grup 3: 2.83 ± 0.40
 Grup 4: 2.66 ± 0.52
 Grup 5: 1 ± 0.63
 Grup 6: 1.66 ± 0.51

Grup 1 (Kontrol grubu)'deki değerler, grup 2, 3, 4 ve 6'dan anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$ ve $p < 0.05$). Ancak grup 5 ile anlamlı farklılık bulunmadı. Grup 3 ve

4'teki histolojik hasar diğer gruplardan (grup 2, 5 ve 6) anlamlı olarak yüksek bulundu (Grup 3: - $p < 0.01$, Grup 4: $p < 0.05$). Diğer gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Resim 1 ve 2'de grup 3 ve 4'teki histopatolojik hasar düzeyi görülmektedir.

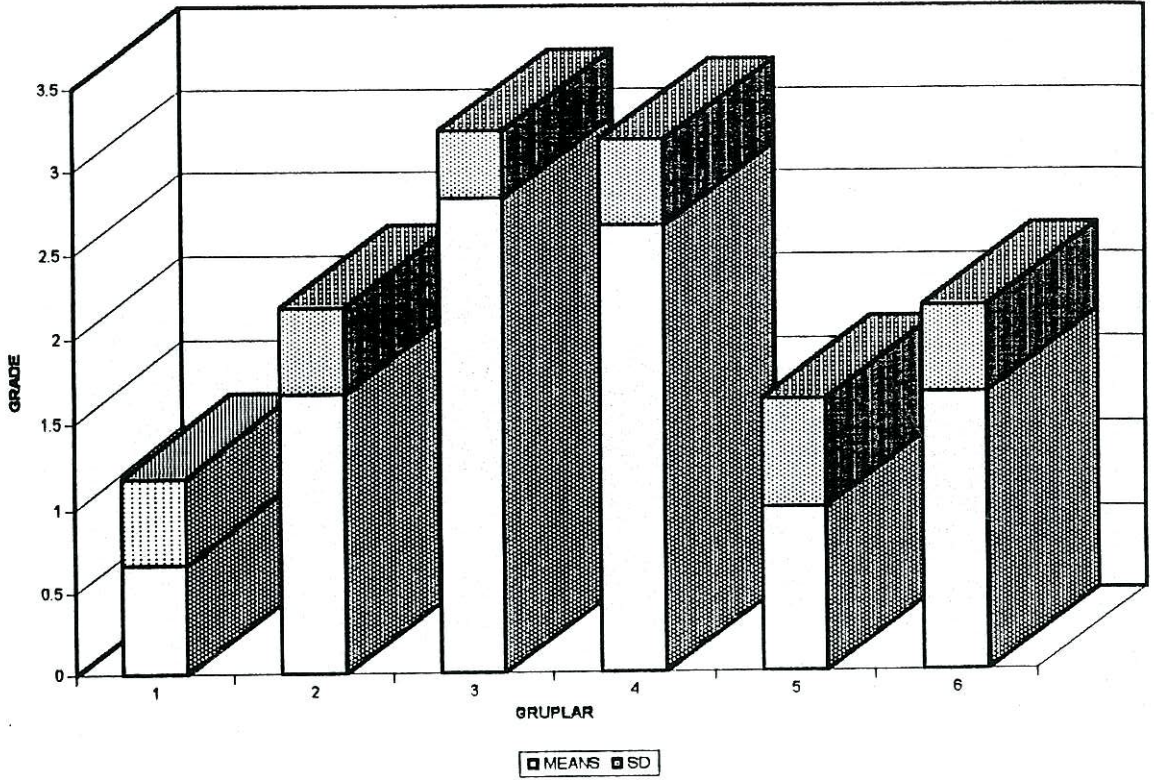


RESİM 1: Grup 3'teki histopatolojik bulgular (Grade 3, HEx200)

TARTIŞMA

Vasküler endotelial hücreler, trombositler, mast hücresi, makrofajlar gibi bazı hücrelerde L-arginin amino asidinden sentez edilen ve güç-

HISTOPATOLOJİK GRADE

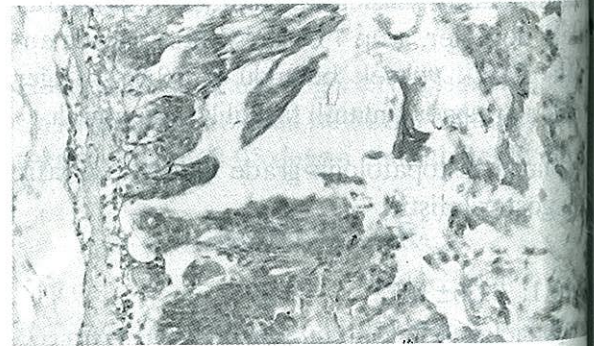


GRAFİK 2: Grupların histopatolojik grade değerleri

lü bir vazodilatör madde olan nitrik oksit (NO); kan basıncı, vasküler tonüs ve bölgesel kan akımının regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. EDRF'nin (endothelium-derived relaxing factor) NO ile aynı kimyasal yapıda olduğu gösterilmiştir. NO solubl guanilat siklaz'ın stimülasyonu yoluyla vasküler düz kasları relakse eden, trombosit aggregasyonunu ve lökosit infiltrasyonunu inhibe eden labil bir maddedir. İn vitro olarak ise NO'nun postkapiller venüllerdeki endotel hücrelere lökosit yapışmasını inhibe edici özelliğinin olduğu, mukozada vazodilatör etkiye sahip olduğu, NO sentezinin azalması halinde lökosit infiltrasyonunun arttığı, vazokonstriksiyonun geliştiği gösterilmiştir.^{10,14} Arginin analogu olan N_G-monomethyl-L- arginin ve N_G Nitro-L- argininin (N_GNA), NO sentetaz enzimini bloke ederek NO oluşumunu önler, ancak bu etkisi L-arginin verilmesi ile antagonize edilmektedir.^{10,11,13}

Etanolla oluşan mide hasarında serbest oksijen radikallerinin etkinliğini gösteren birçok çalışma vardır.^{1,2,5} Saf etanolün intragastrik verilmesin-

den birkaç dakika sonra, mide mukozası lipoperoksit düzeyinin yükseldiği ve nonprotein sülfidril (redükte glutatyon) düzeylerinin düştüğü bildirilmektedir.^{15,16} Oluşan mukozal hasar, histopatolojik olarak hücresel bozukluklar ve nekrozun varlığıyla tanımlanmaktadır.^{1,2,4}



RESİM 2: Grup 5'teki histopatolojik bulgular (Grade 1, HEx200)

Bu çalışmada NO'in etanolla oluşan mide hasarı üzerine etkisi kantitatif yöntemle araştırıldı. NO vasküler endotel ve barsak endoteli tarafından üretilen ve hızla süperoksit tarafından inaktive edilen biyolojik olarak aktif, ancak labil bir komponenttir. Gastrik mukozadaki kan akımı

da modülatör etkisinin olduğu, NO ile oluşan hipereminin önlenmesi halinde midede hasar oluşumunun kolaylaştığı saptanmıştır.^{13,14}

Çalışma gruplarının seçiminde iki özellik ön plana alınmıştır. İlk endojen kaynaklı NO'in inhibisyonunun mide mukozasında oluşacak hasarı arttırmadığını araştırmak, ikincisi ise dışarıdan verilen L-Arginin'in NO sentezini arttırması sonucu bu hasarın azalıp, azalmadığının kantitatif olarak kanıtlanmasıdır. Çalışmanın ilk bölümünü oluşturan kısım için grup 1, 2 ve 3 kullanılmıştır. İlk iki grupta mide hasarı oluşmadığı için beklenildiği gibi mide mukozasında NO inhibisyonunun hücre hasarını arttırmadığı, gerek mikroskobik gerekse biokimyasal olarak ortaya konulmuştur. 3. grupta ise endojen NO üretiminin N_vNA ile bloke edilmesinden sonra verilen etanol tüm gruplar içerisinde en yüksek hasarı oluşturmuştur. Öyleki bu hasar istatistiki açıdan etanolün tek başına kullanıldığı grupta oluşan hasardan daha fazla olmuştur (p<0.05). NO gastrik mukozal kan akımının arttırılmasında ve mukozal bütünlüğün korunmasında önemli rol oynamaktadır. NO inhibisyonu ile gastrik mukozal kan akımının azaldığı ve mukozal hasarın arttığı bildirilmektedir.^{13,14} Bu bulgular önceden tanımlanan iskemi-reperfüzyon hasarının oluşmasının endojen NO miktarının azalmasına yol açtığını belirten çalışmalar ile uyumludur.^{13,17,18}

Grup 4'te herhangi bir ön tedavi yapılmaksızın etanol verilmesi, kontrol grubu ile kıyaslandığında; lipid peroksidasyonunu ve histopatolojik olarak hasarı anlamlı olarak arttırdığı saptandı (p<0.01). Bu durum daha önce yapılan çalışmalarla da uyumludur.^{1,2,15,16}

Grup 5'de ekzojen L-arginin ile birlikte etanol uygulaması; hem lipid peroksit düzeyini, hem de histopatolojik hasarı etanol grubuna göre anlamlı azaltması L-arginin'in sitoprotektif etkisini göstermektedir. Beyin, akciğer ve miyokardın iskemi-reperfüzyon hasarında da benzer şekilde L-arginin'in sitoprotektif etkisinin gösterilmesi sonuçlarımızı desteklemektedir.^{18,20} Grup 6'da etanol uygulanmasından önce N_vNA verilmesinin özelliği grup 3'te gösterilmesine rağmen, buna ilaveten dışarıdan verilen L-Arginin'in NO inhibisyonunu tersine çevirerek hasarı azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuç exvivo gastrik odacık

oluşturularak sadece mikroskobik olarak oluşan hasarın gözlemlendiği Mac Noughtan ve arkadaşlarının sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.³

Sonuç olarak; etanolle oluşan mide mukozal hasarının azaltılmasında ekzojen verilen L-arginin hem lipid peroksidasyonunu, hem de histopatolojik hasarı önleyerek sitoprotektif etkisinin olduğu gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Szelenyi I, Brune K: Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci* 1988, 33:865-871.
2. Bou-Abboud CF, Wayland H, Paulsen G, Guth PH: Microcirculatory stasis precedes tissue necrosis in ethanol-induced gastric mucosal injury in the rat *Dig Dis Sci* 1988, 33(7):872-877.
3. Mac Noughton WK, Cirino G, Wallace JL: Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. *Life Sciences* 1989, 45(20):1869-1876.
4. Lacy ER, Ito S: Microscopic analysis of ethanol damage to rat gastric mucosa after treatment with a prostaglandin. *Gastroenterology* 1982, 83:619-625.
5. Perry MA, Wadhwa S, Parks DA, Pickard W, Granger DN: Role of oxygen radicals in ischemia-induced lesions in the cat stomach. *Gastroenterology* 1986:362-367.
6. Parks D, Bulkley GB, Granger DN: Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery* 1983, 94:415-422.
7. Wellbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Voleri CR, Shepro D, Hechtman HB: Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991, 78:651-655.
8. Pmpella A, Maellaro E, Casini AF, Ferrali M, Ciccoli L, Comporti M: Measurement of lipid peroxidation in vivo: A comparison of different procedures. *Lipids* 1987, 22(3):206-211.
9. Uchiyama M, Mihara M: Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Ann Biochem* 1978, 86:271-278.
10. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991, 43:109-142.
11. Moncada S: The L-arginine: Nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992, 145:201-227.
12. Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci* 1991, 88:4651-4655.
13. Pique JM, Whittle BJR, Esplugues JV: The vasodilator role of endogenous nitric oxide in the rat gastric microcirculation. *Eur J Pharmacol* 1989, 174:293-296.
14. Podolsky RS, Grabowski M, Milner R, Ritchie WP, Dempsey DT: Capsaicin-induced gastric hyperemia and protection are NO dependent. *J Surg Res* w994, 57:438-442.
15. Szabo S, Trier JS, Brown A, Seonnor J: Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology* 1985, 88:228-236.
16. Mizui T, Doteuchi M: Lipid peroxidation: A possible role in gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sci* 1986, 38:2163-2167.

17. Pique JM, Esplugues JV, Whittle BJR: Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vazodilatation during acid secretion. *Gastroenterology* 1992, 102:168-174.
18. Abdih H, Kelly CJ, Burke P, Bouchier-Hales D, William R, Watson G, Redmond HP, Burke P, Bouchier-Hayes DJ: Nitric oxide (endothelium-derived relaxing factor) attenuates revascularization-induced lung injury. *J Surg Res* 1994, 57:39-43.
19. Masini E, Bianchi S, Mugnai L, et al: The effect of nitric oxide generators on ischemia reperfusion injury and histamine release in isolated perfused guinea-pig heart. *Agent Action* 1991, 33:53-56.
20. Morikawa E, Rosenblatt S, Moskowitz MA: L-arginine dilates rat pial arterioles by nitric oxide-dependent mechanisms and increases blood flow during focal cerebral ischemia. *Br Pharmacol* 1992, 107:905-907.