

Sıçanlarda Etanole Bağlı Olarak Geliştirilen Mide Mukozası Hasarı Üzerine Allopürinolün Etkisi

Dr. Nadir YÖNETÇİ, Dr. A. Ömer ÖZÜTEMİZ, Dr. Tijen TANYALÇIN,
Dr. Fatma KUTAY, Dr. Yücel BATUR

Özet: Son yıllarda çalışmalar oksijenden türeyen serbest radikallerin hücre hasarında önemli roller oynadığını göstermektedir. Ksantin oksidaz enzimi organimada oksijen türevi serbest radikallerin oluşumunda rol oynayan önemli bir kaynaktır. Allopürinol ksantin oksidaz enziminin kompetitif bir inhibitörü olup, hücre hasarını azaltması beklenen bir ajandır. Bu çalışmada sıçanlarda geliştirilen etanole bağlı mide mukoza lezyonlarını önlemede, allopürinolün koruyucu rolü ve mide mukozası total sülfidril düzeyine olan etkisi araştırılmıştır. Her iki cinsten Wistar albino sıçanlar dört (n:10) gruba ayrıldılar ve 18 saat açlığı takiben şu işlemler yapıldı. I-Sadece aç bırakıldılar, II-1 ml serum fizyolojik og. (orogastrik), III-1 ml %10 allopürinol og. IV-Aynı III. gruptakiler gibi işlem yapıldı, ancak allopürinol verilmeden yarım saat önce 5mg/kg dozda indometacin sc. verildi. İkinci, üçüncü ve dördüncü gruptaki hayvanlara bu işlemlerden 1 saat sonra 1 ml %96 etanol og verildi ve bundan 1 saat sonra bütün gruplardaki hayvanlar öldürülerek midelelerinde gelişen makroskopik lezyonlar incelendi ve mukoza örneklerinde total sülfidril düzeyi (nmol/mg protein) tayin edildi. Serum fizyolojik verilen grupta ortalama lezyon alanı $69.3 \pm 17.5 \text{ mm}^2$ ortalama lezyon uzunluğu ise $40.5 \pm 9.2 \text{ mm}$ saptanırken, bu değerler allopürinol grubunda sırasıyla 25.5 ± 7.2 ve 17.3 ± 3.1 'dir ($P < 0.05$). Mukoza total sülfidril düzeyleri ise gruplarda sırasıyla 37.9 ± 6.9 , 25.0 ± 8.5 , 35.7 ± 11.5 ve 37.2 ± 8.8 saptanmıştır. İndometacin verilmesi deney sonuçlarını etkilememiştir. Sonuç olarak allopürinolün %10'luk çözeltisi sıçanlarda geliştirilen etanole bağlı mikroskopik gastrik mukozal lezyonları belirgin olarak azaltmaktadır. Allopürinolün bu etkisi artmış gastrik total sülfidril düzeyi ile birliktedir.

Anahtar kelimeler: Mukozal korunma, allopürinol, mide mukozası total sülfidril düzeyi.

Çeşitli kimyasal ajanların uygulanmasıyla (aspirin ve etanol gibi) veya fizik stresler (termal

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları, Gastroenteroloji, Biyokimya Anabilim Dalı.

Summary: CYTOPROTECTIVE EFFECT OF ALLOPURINOL ON ETHANOL INDUCED GASTRIC MUCOSAL DAMAGE IN RATS

The susceptibility of the gastric mucosa to various noxious stimuli can be reduced by a variety of substances, a phenomenon termed cytoprotection. Recent studies have shown that oxygen derived free radicals (OFR) play an important part in damage to the cells. The enzyme xanthine oxidase (XO) is one of the potential sources of OFR in the organism. The aim of this study was to investigate the effect of allopurinol, an inhibitor of XO, on the gastric mucosal lesion and the total sulphhydryl concentration of gastric mucosal lesion and on the total sulphhydryl concentration of gastric mucosa produced with ethanol in rats. Wistar albino rats (n:10) divided into 4 groups were given: I-No treatment, II-1ml of saline og, III-1 ml of 10% allopurinol og., IV-Indomethacin 5 mg/kg sc 30 minutes before given 1 ml of 10% allopurinol. One hour later all animals were given 1 ml of 96% ethanol og. with the exception of the first group. All animals were sacrificed one hour later followed by the removal of their stomachs and evaluation of the developing lesions in respect of area and length. Gastric mucosal total sulphhydryl content levels were determined and expressed as nmol/mg. protein. Pretreatment with allopurinol significantly reduced the severity of ethanol-induced gastric mucosal lesions ($P < 0.05$). The gastric mucosal total sulphhydryl levels were found 37.9 ± 6.9 , 25.0 ± 8.5 , 35.7 ± 11.5 , and 37.2 ± 8.8 respectively. Pretreatment with allopurinol inhibited the reduction of gastric mucosal total sulphhydryl content against to control group. Pretreatment with indomethacin did not prevent or reduced the protection induced by allopurinol. In conclusion, 10% solution of allopurinol appear to reduce significantly the gastric mucosal lesions produced with ethanol in rats.

Key words: Gastric cytoprotection, allopurinol, total mucosal sulphhydryl content.

hareketsizlik gibi) sonucunda gerek deney hayvanlarında gerekse de insanlarda mide ülserleri ve mide mukozası hasarı meydana gelmektedir. Bu gibi zararlı stimülüslerin mide mukozası

Tablo I: Sıçanlarda etanole bağlı gelişen mide mukozası lezyonlarının değerlendirilmesi.

	Lezyon Alanı (mm ²)	Lezyon Uzunluğu (mm)	Total Sülfidril (nmol/mg protein)
I. Grup	-	-	37.94±6.94
II. Grup	69.3±17.5	40.5±9.2	25.06±8.57*
III. Grup	25.5±7.2**	17.3±3.1**	35.70±11.52
IV. Grup	27.4±9.3**	19.7±7.1**	37.21±8.81

*: Grup I, III ve IV'e göre istatistiki olarak ($p<0.05$) düşüktür.

** : Grup II'ye göre istatistiki olarak ($p<0.05$) düşüktür. Veriler ortalama±SD olarak gösterilmiştir. (Student t testi).

üzerine olan olumsuz etkileri bazı maddeler ile azaltılabilmekte ve bu olaya da "sitoproteksiyon" denilmektedir(1). Bu konuda yapılan çalışmalar gastrik sitoproteksiyonda prostaglandinlerin önemli roller oynadığını göstermiştir(1,2). son yıllarda yapılan çalışmalar oksijenden türeyen serbest radikallerin (OSR), iskemi veya etanol verilerek geliştirilen gastrik mukozal hasarda önemli roller oynadığını göstermektedir(3,6). Ksantin oksidaz enzimi (XO) organizmada OSR'in oluşumunda rol oynayan önemli bir kaynaktır ve birçok memelinin mide mukozasında yer almaktadır(3,7). Allopürinol XO enziminin kompetitif bir inhibitörü olup, serbest radikal oluşumunu azaltarak hücre hasarını hafifletmektedir. Daha önce yaptığımız bir çalışmada, allopürinolün sıçanlarda etanolla geliştirilen gastrik mukozal hasarı azalttığını göstermiştik (8). Bu çalışmamızın amacı, allopürinolün sıçanlarda etanolla geliştirilen gastrik mukozal hasarı önleyici etkisini yeniden test etmek ve özellikle inide mukozası total sülfidril düzeyine olan etkilerini incelemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvanlar: Çalışmada ortalama ağırlıkları 180-225 g. olan 40 adet her iki cinsten Wistar albino sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Merkezi'nden sağlanmış olup, standart sıçan yemi ile beslenmişlerdir. Hayvanlar 5'li gruplar halinde kafeslerde tutulmuşlar ve altlarındaki ağ şeklindeki delikli tel sistemi ile dışkılarını yemeleri engellenmiştir. Deneyin başlamasından 18 saat önce aç bırakılan sıçanların 12 saat öncesinden su içmeleri engellenmiştir.

Deney: Hayvanlara oral olarak verilen maddeler

16 no pediatrik plastik sonda yardımı ile orgastrik (og.) olarak verilmiştir. Bu işlem sırasında hayvanlar eter anestezisi ile uyutulup dilleri özel delikli tahta ile ekarte edilerek og. entübasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sonda su kabına tutularak akciğer yerine mideye girildiğinden emin olunduktan sonra maddeler verilmiştir. Onar hayvanlık rastgele 4 gruba ayrılan sıçanlara daha sonra şu işlemler yapılmıştır:

I. Grup: Herhangi bir işlem yapılmadı

II. Grup: 1ml serum fizyolojik, og. yolla verildi. (Kontrol grubu)

III. Grup: 1ml allopürinol, %10 luk solüsyon şeklinde og. yolla verildi.

IV. Grup: Aynı III. gruptakine benzer işlemler yapıldı, ancak allopürinol verilmeden yarım saat önce 5mg/kg dozda indometacin sc olarak uygulandı.

İkinci, üçüncü ve dördüncü gruptaki sıçanlara bu işlemlerden 1 saat sonra 1 ml %96 etanol og. yolla verilmiştir. Birinci gruptaki hayvanlara ise yine herhangi bir işlem yapılmamıştır. Bundan 1 saat sonra tüm hayvanlar aşırı doz eter verilerek sakrifiye edilmiştir. Daha sonra batin açılarak mideler çıkarılmış ve mideler büyük kurvatur boyunca açılarak gelişen lezyonlar milimetrik şeffaf asetat yardımıyla ölçülüp kaydedilmiştir. Bundan sonra rektoskop biyopsi forsesi kullanılarak midelerden alınabildiği kadar çok sayıda mukoza örnekleri alınmış ve steril tüplere konulup parafin ile kapatıldıktan hemen ekşi 20°'de derin dondurucuda saklanmıştır. Bu örneklerden 1 hafta içinde Sedlack ve Lindsay'ın (9) tarif ettiği yöntem ile total sülfidril düzeyleri tayin edilmiştir. Protein ölçümünde ise Lowry (10) yöntemi kullanılmış ve mukoza total sülfidril düzeyleri nmol/mg protein olarak belirtilmiştir.

İstatistiksel analiz: Elde edilen sonuçlar Ege Üniversitesi Bilgi İşlem Merkezi'nde Minitab paket programı kullanılarak değerlendirilmiş ve student t testi ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar ortalama ± SD olarak sunulmuştur.

SONUÇLAR

Sıçanlarda gelişen hemorajik gastrik lezyonların

uzunluk ve alanları ile mukoza total sülfidril düzeyleri Tablo I'de gösterilmiştir. Etanolden önce serum fizyolojik verilen sıçan midelerinde makroskopik olarak çok belirgin hemorajik bandlar şeklinde yaygın mukoza hasarı gelişirken, %10 allopürinöl verilen sıçanlarda makroskopik lezyonlar daha hafif olarak gözlenmiştir. Allopürinöl ortalama lezyon uzunluğunu ve ortalama lezyon alanını kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaltmıştır ($P<0.05$). Daha önceden endojen prostaglandin inhibe edici dozda indometacin verilmesi deney sonuçlarını etkilememiştir. Hiçbir madde verilmeyen ve aynı deney şartlarında tutulan sıçanlarda mukozal total sülfidril düzeyi 37.94 ± 6.94 nmol/mg protein bulunmuştur, allopürinöl grubunda bu düzey 35.70 ± 11.52 nmol/mg protein olup, bu iki grup birbiri ile benzerdir. Kontrol grubu olarak aldığımız II. grup hayvanlarda ise mukoza total sülfidril düzeyi ortalaması (25.06 ± 8.57 nmol/mg. protein) diğer iki gruptan anlamlı olarak düşük saptanmıştır. (Tablo I).

TARTIŞMA

Bu çalışmada allopürinöl, sıçanlarda etanolle geliştirilen gros mide lezyonlarını azaltmıştır, bu sonuç daha önceki araştırmalar ile (5,8) benzerdir. Allopürinölün koruyucu etkisi büyük olasılıkla XO enzimini inhibe ederek OSR oluşmasını engellemesine bağlıdır. XO enzimi hangi mekanizmalar ile etanolün midede geliştirdiği hasarda rol oynamaktadır? Bu konuda iki görüş öne sürülmektedir. Birinciye göre (11), insan mide mukozasında da bol miktarda bulunan alkol dehidrogenaz enzimi ile etanol okside edilir ve asetaldehid oluşur. XO enzimi ise aset aldehitin oksidasyonunda önemli rol oynar ve bu işlem sırasında da oksiradikaller açığa çıkar. İkinci görüşe göre (12) XO, Granger ve arkadaşlarının (13) tarif ettikleri iskemi reperfüzyon hasarında olduğu gibi rol oynamaktadır. Buna göre iskemik dokuda hipoksantin birikmekte ve reperfüzyon olduğunda biriken hipoksantinden XO etkisiyle ksantin ve süperoksid anyonu oluşmaktadır. Ortamda bulunan bu çok reaktif madde daha sonra süper oksid dismutaz aracılığı ile hidrojen perokside o da katalaz yardımı ile su ve moleküler oksijene dönüşür. Guth ve arkadaşları(14) etanol etkisi ile mide mukozal kan akımının azaldığını ve mikrovasküler staz mey-

dana geldiğini göstererek bu ikinci görüşe katkıda bulunmuşlardır.

Çeşitli dokularda lipid peroksidasyonun artması ve nonprotein sülfidrillerin düzeyinin azalması okside edici maddelerin aşırı üretildiğini gösterir(12,15). Sıçanlara absolü alkolün intragastrik olarak verilmesinden birkaç dakika sonra mide mukozası lipid peroksid düzeyi artar ve mukoza nonprotein sülfidril düzeyi düşer. Nonprotein sülfidril, çeşitli serbest radikalleri içerdikleri sülfidril grupları ile bağlayarak uzaklaştırmak yeteneğine sahiptirler. Redükte glutation, endojen nonprotein sülfidrillerin temel ögesini oluşturur ve organizmada en zengin olarak bulunduğu dokulardan birisi de mide mukozasıdır(16). Birçok araştırmacı bu nonspesifik antioksidan bileşiklerin gastrik sitoproteksiyonda önemli rol oynadığını düşünmektedir(17,18). Bizim sonuçlarımıza göre allopürinöl gastrik mukozayı etanole karşı korumuş ve mide mukozasında total sülfidril düzeyinin azalmasını engellemiştir. Bu durum büyük olasılıkla XO enzim inhibisyonu ile OSR oluşumunun engellenmesine bağlıdır. Ancak daha önce yapılan ve allopürinölün etanolle geliştirilen gastrik mukozal lezyonları önleyici etkisini araştıran çalışmalarda mukozal sülfidril düzeyleri tayin edilmediği için bir karşılaştırma yapamamaktayız. Deneysel hayvan çalışmalarında Szabo ve arkadaşları(17,18) mukozal glutation düzeyini arttıran uygulamaların (örneğin cysteamine verilmesi) etanolle geliştirilen gastrik mukoza hasarını azalttığını göstermişler, buna karşın Robert ve arkadaşları(19) ise dietil maleat vererek mukozal glutation düzeyini azaltmanın mide mukozasını etanole karşı koruduğunu yayınlayarak tam tersi sonuca ulaşmışlardır. Son zamanlarda Takeuchi ve arkadaşları (20) yaptıkları çalışmada cysteaminin sıçan mide mukozası sülfidril düzeyini artırdığını, dietil maleatın ise azalttığını ve bu iki maddenin de etanole karşı mideyi koruduğunu yeniden test etmişlerdir. Ancak adı geçen araştırmacılara göre bu iki maddenin mukoza koruyucu etkileri, mukozal sülfidril düzeyinden bağımsız olup, esas olarak mide motilitesini azaltmasına bağlıdır. Bizim çalışmamızda motilite incelenememiştir. Mutoh ve arkadaşları(21) ise primer gastrik fundus mukozası kültüründe yaptıkları çalışmada, etanolün invitro zararlı etkisine karşı intraselüller glutationun önemli rol oyna-

dığını ve bu sitoproteksiyonda okside glutationa oranla redükte glutationun önemli olduğunu göstermişlerdir. Konu ile ilgili çalışmalar hala daha sürüp gitmektedir.

Allopürinol verdiğimiz hayvanlarda önceden endojen prostaglandin inhibe edici dozda kullandığımız indometasin deney sonuçlarını etkilememiştir. Bu yöntem gastrik sitoproteksiyonda rol oynadığı düşünülen ilaçların etkilerinin prostaglandinlerden bağımsız olup olmadığını araştırmada sık olarak kullanılan bir yöntemdir(22). Bu sonuca göre allopürinolün etkisinin prostaglandinlerden bağımsız olması çok olasıdır. Sitoproteksiyon kavramı 1970'li yılların sonunda, de-

neysel modellerde midenin çeşitli zararlı ajanlara karşı korunması anlamında ve prostaglandinlerle ilgili olarak doğmuştur(1). Bugün gelinen noktada işin ilginç tarafı prostaglandin sentetaz ve lipooksijenaz yolları reaktif oksijen bileşiklerinin oluşmasında önemli potansiyel kaynaklar olarak karşımıza çıkmaktadır.

Sonuç olarak allopürinol sıçanlarda geliştirilen etanole bağlı mide hasarını azaltmakta ve mide mukozası total sülfidril düzeyini yükseltmektedir. İnsanlarda gastrointestinal hastalıklarda kullanımı konusunda ise daha uzun ve kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

- Robert A, Nezamis E, Lancaster C, et al. Cytoprotection by prostaglandins in rats. *Gastroenterology* 1979; 77:433-443.
- Miller TA. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: Current knowledge and proposed mechanisms. *Am J Physiol* 1983; 245: G601-G606.
- Itoh M, Guth PH. Role of oxygen derived free radicals in hemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterology* 1985; 90: 1103-1110.
- Smith SM, Grisham MB, Mancini EA, et al. Gastric mucosal injury in the rat: Role of iron and xanthine oxidase. *Gastroenterology* 1987; 92: 950-955.
- Terano A, Hiraishi H, Ota S, et al. Role of oxygen-derived free radicals in ethanol-induced damage in the rat stomach. *Gastroenterology* 1986; 90: 1661-1669.
- Szelenyi A, Vergin H, Shickaneder H. Gastric mucosal damage and oxygen free radicals. *Gastroenterology* 1986; 1665-1660.
- Perry MA, Wadhwa S, Parks DA, et al. Role of oxygen radicals in ischemia-induced lesions in the cat stomach. *Gastroenterology* 1986; 90: 362-365.
- Özütemiz Ö, Akarca U, Batur Y, Aydın HH, Çavuşoğlu H. Cytoprotective effect of allopurinol on gastric mucosa in rats. *Gut* 1992; 33: F238.
- Sedlack J, Lindsay RH. Estimation of total proteinbound and nonprotein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 1968; 25: 192-205.
- Lowry O.H, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Videla LA, Valenzuela A. Alcohol ingestion, liver glutathione and lipidperoxidation: Metabolic interrelations and pathological implications. *Life Sci* 1982; 31: 2395-2398.
- Smith MS, Kviety PR. Gastric ulcers: Role of oxygen radicals. *Critical Care Medicine* 1988; 16: 892-898.
- Granger DN, Rutili G, Mc Cord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981; 81: 22-28.
- Guth PH, Paulsen G, Nagata H. Histologic and microcirculatory changes in alcohol-induced gastric lesions in the rat: Effect of prostaglandin cytoprotection. *Gastroenterology* 1984; 87: 1083-1089.
- Mizui T, Doteuchi M. A possible role in gastric damage induced by ethanol in rats. *Life Sci*. 1986; 38: 2163-2166.
- Boyd SC, Sasame HA, Boyd MR. High concentration of glutathione in glandular stomach: Possible implications for carcinogenesis. *Science* 1979; 205:1010-1014.
- Szabo S, Terier JS, Frankel PW. Sulphydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science* 1981; 214: 200-202.
- Miller TAD, Li Y, Kuo J, et al. Nonprotein sulphhydryl compounds in canine gastric mucosa: Effects of PGE2 and ethanol. *Am J Physiol* 1985; 249: G137-G144.
- Robert A, Eberle D, Kaplowitz N. Role of glutathione in gastric mucosal cytoprotection. *Am J Physiol* 1984; 247: G296-G304.
- Takeuchi K, Okada M, Niida H, et al. Role of sulphhydryls in mucosal injury caused by ethanol: Relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. *J Pharmacol Exper Ther* 1989; 248: 836-841.
- Mutoh H, Hiraishi H, Ota S, et al. Protective role of intracellular glutathione against ethanol-induced damage in cultured rat gastric mucosal cells. *Gastroenterology* 1990; 98: 1452-1459.
- Wallace JL. Increased resistance of the rat gastric mucosa to hemorrhagic damage after exposure to an irritant. Role of the "mucoid cap" and prostaglandin synthesis. *Gastroenterology* 1988; 94: 22-32.