

Yanıkta mide mukoza hasarı üzerine antitrombin III'ün etkisi: Ratlarda deneysel çalışma

The effect of antithrombin III on gastric mucosal injury in burn: An experimental study in rats

Mustafa YILMAZ¹, Özkan HEREK², Neşe DEMİRKAN³

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji¹, Pediatric Cerrahi ABD², Patoloji ABD³, Denizli

Giriş ve amaç: Akut gastrik mukozal lezyonların patofizyolojisini belirlemeyi amaçlayan bir çok çalışma yapılmış olmasına rağmen, patogenezini hala net olarak ortaya konulamamıştır. Bunlarda mide mukozasının iskemisi ve mukus salgısındaki azalmanın ana rolü oynadığı düşünülmektedir. Antitrombin III (ATIII)'ün iskem-reperfüzyon modellerinde nötrofil infiltrasyonunu baskıladığı ve prostocycilin I₂ (PGI₂)'nin sekresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bundan yola çıkarak yanık oluşturulan ratlarda ATIII'ün gastrik mukozal lezyonlar üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. **Gereç ve yöntem:** Otuz adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat çalışmaya alındı. Ratlar randomize olarak 3 gruba ayrıldı. Grup II ve III ratlarda 95 °C su ile 10 saniye sürede sırt bölgelerinde total vücut yüzeyinin %30'ü yanık oluşturuldu. Sham grubunda (grup 1) ratlar 21 °C suda 10 sn tutuldu. Grup III ratlara yanık oluşturulmadan 15dk önce 250U/kg dozunda juguler ven yoluyla ATIII verildi. Grup I ve II ratlara plasebo amacıyla 1ml %0.9 NaCl aynı yol ile verildi. Yanık oluşturulmasından 12 saat sonra tüm ratlar yüksek doz anestetik verilerek öldürüldü ve mideleri alınarak büyük kurvatur boyunca açıldı lezyonlar makroskopik olarak incelendi. Bu işlemden sonra histolojik değerlendirme yapıldı. **Bulgular:** Grup 1 de makroskopik ve mikroskopik mide lezyonu saptanmadı. Grup II' de makroskopik olarak 2 ratta hiperemi ve bir ratta erezyon saptandı. Histolojik olarak 5 ratta (%50) akut gastrit saptanırken ATIII verilen (Grup 3) grupta hiçbir ratta akut gastrit bulgusu saptanmadı (p<0.05). **Sonuç:** Bu sonuçlara göre yanık oluşturulan ratlarda gastrik mukozal lezyonlar daha çok nötrofil infiltrasyonu (akut gastrit) şeklinde ortaya çıkmaktadır. ATIII ile bu lezyonlar önenebilmektedir. ATIII gastrik mukozal lezyonların önlemek amacıyla yanıkta hemen sonra erken dönemde kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: Yanık, gastrik mukoza, antitrombin III

Background and aims: Although many studies have been made to define the pathophysiology of acute gastric mucosal lesion, its pathogenesis is still not clearly defined. The ischemia of gastric mucosa and decrease in mucus secretion are considered the main causes of acute gastric lesions. It has been shown that antithrombin III (ATIII) inhibits neutrophil infiltration in ischemia-reperfusion injury and increases the secretion of PGI₂. The aim of this study was to evaluate the effects of ATIII on gastric mucosal lesions in burned rats. **Materials and methods:** Thirty Sprague-Dawley male rats were used. They were divided into three groups. A sham burn group (Group 1, n:10) was exposed to 21 °C water. A burn group (Group 2, n:10) and burn + ATIII group (Group 3, n:10) were exposed to 95 °C water for 10 sec., producing full-thickness burn in 30% of total body surface. Group 3 rats received 250 U/kg ATIII via right jugular vein, 15 minutes before burn injury. One ml 0.9% NaCl was given as placebo in Group 1 and Group 2 rats by the same route. The rats of all three groups were killed 12 hours after burn injury by an overdose anesthetic. The stomachs of all the rats were removed and opened along great curvature. Specimens were first evaluated macroscopically. A pathologist evaluated the hisopathologic specimens blindly. **Results:** There was no macroscopic or microscopic gastric lesions in Group 1. In Group 2, hyperemia in two rats, and erosion in one rat were found macroscopically. Histopathologic examinations revealed acute gastritis in 5 rats (50%) of Group 2; however, there was no acute gastritis in rats treated with ATIII (Group 3) (p<0.05). **Conclusion:** According to these results, gastric lesions of burned rats generally occurs as neutrophil infiltration (acute gastritis). These lesions can be prevented by the administration of ATIII. Antithrombin III may be used effectively to prevent the gastric mucosal lesions in the early period of burn injury.

Key words: Burn, gastric mucosa, antithrombin III

GİRİŞ VE AMAÇ

Yanıklı hastalarda ortaya çıkan akut gastrik ülserler önemli komplikasyonlardan olup kanama ve perforasyon gibi hastanın hayatını tehdit edebilecek klinik sonuçlara yol açabilmektedir. Peptik ülser tedavisindeki ilerlemeye bağlı olarak yanıklı hastalardaki mide lezyonlarına bağlı morbidite ve mortalitede belirgin azalma olmasına rağmen ciddi yanıklı hastalarda bu durum hala sorun olmaya devam etmektedir. Akut

gastrik mukozal lezyonların patofizyolojisini belirlemeyi amaçlayan birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, patogenezini hala net olarak ortaya konulamamıştır. Endotoksik ve hemorajik şoka bağlı gastrik lezyonların gelişmesinde ana rolü gastrik mukozal iskemisinin oynadığı bilinmektedir (1, 2). Fakat yanığa bağlı ülserlerin patogenezini net olarak ortaya konulamamıştır. Kronik ülser hastalığında asit salgısının ana rolü oynama-

sına karşın yanığa bağlı gastrik mukozal lezyonlar ile asidite ve gastrin düzeyi arasında ilişki bulunmadığı gösterilmiştir (3, 4). Bunlarda mide mukozasının kan akımındaki azalmaya sekonder olarak ortaya çıkan mukozal koruyucu mekanizmalardaki defektin ana etken olduğu kabul edilmektedir (5). Oluşan mide mukoza hasarına bağlı hidrojen iyonlarının geri emilmesinde artışının mide mukozası lezyonlarının oluşmasında ana rolü oynadığı belirtilmektedir. Mukozal koruyucu mekanizmaların başında mukozal kanlanma ve mukus salgısı gelmektedir ki bu iki durumun idamesinde prostoglandinler özellikle Prostacyclin - I₂ (PGI₂) önemli rol oynamaktadır.

Antithrombin III (ATIII) major antikoagulan olup kan koagülasyon kaskadında thrombin gibi serine proteazların aktivitesini inhibe etmektedir (6). Ayrıca ATIII'ün endotel hücrelerinin yüzeylerindeki glycosaminoglycan'larla etkileşerek PGI₂ salınımını artırdığı gösterilmiştir (7, 8). ATIII'ün iskemi-reperfüzyon modellerinde nötrofil infiltrasyonunu baskıladığı ve PGI₂'nin sekresyonunu artırdığı gösterilmiştir. PGI₂'nin vazodilatatör etkisi yanısıra, trombosit agregasyonunu ve lökosit aktivasyonunu güçlü şekilde inhibe etme özelliği bulunmaktadır (9). Bundan yola çıkarak yanık oluşturulan ratlarda ATIII'ün gastrik mukozal lezyonlar üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Otuz adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat (180-250gr) çalışmaya alındı. Ratlar randomize olarak 3 gruba ayrıldı. Hayvanlar deney süresince standart hayvan yemi ve su ile beslendi. Ratlar 12 saatlik açlığı takiben 50mg/kg ketamine hydrochloride ve 10mg/kg xylazine intramuskuler olarak verilerek anestize edildi. Anestezi sonrasında tüm ratların sağ boyunları ve tüm sırt bölgeleri traşlandı. Sağ servikal transvers insizyonla sağ juguler venleri ortaya kondu. Grup 3 ratlara 250 U/kg dozunda AT III (Kybernin-P human, Farma-tek) yanık oluşturmadan 15 dakika önce sağ juguler venden verildi. Grup I ve II ratlara 1ml %0.9 NaCl plasebo olarak aynı yolla verildi. Daha sonra Grup II ve III deki ratlar sırt bölgelerinde total vücut yüzey alanının %30'unu bulacak şekilde tam kat yanık oluşturmak amacıyla 95°C kaynar suya 10 saniye süre ile daldırıldı. Sham grubundaki ratlar ise 21°C suya 10 saniye süre ile daldırıldı. Deneyden 12 saat sonra tüm ratlar yüksek

doz anestetik verilerek öldürüldü ve mideleri alınarak büyük kurvatur boyunca açıldı lezyonlar öncelikle makroskopik olarak incelendi. Makroskopik incelemede Rossam ve arkadaşları (10) tarafından tanımlanan mukozal hiperemi ve hemorajik erezyonları 0-3 arasında derecelendirildiği sistem (0: normal mukoza, 1: Hafif hiperemi, 2: Orta derecede hiperemi ve birkaç erozyonu, 3: Şiddetli hiperemi ve multiple erozyonlar) kullanıldı. Bu işlemten sonra histolojik değerlendirme aynı patolog tarafından örneklerin grupları bilmeden kör olarak değerlendirildi.

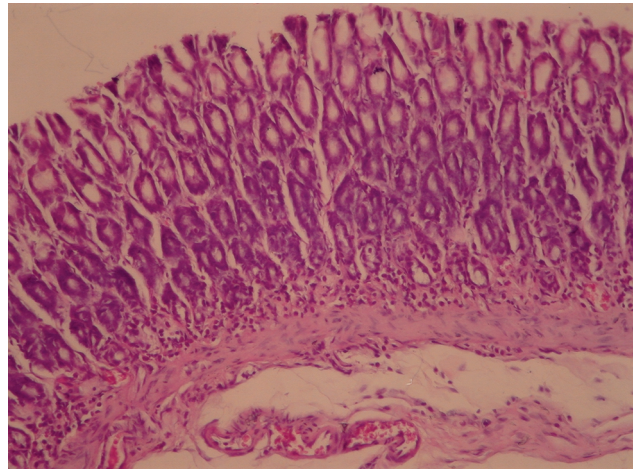
Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak karşılaştırılması Ki-Kare ve Fisher's exact testleri ile yapıldı. P<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

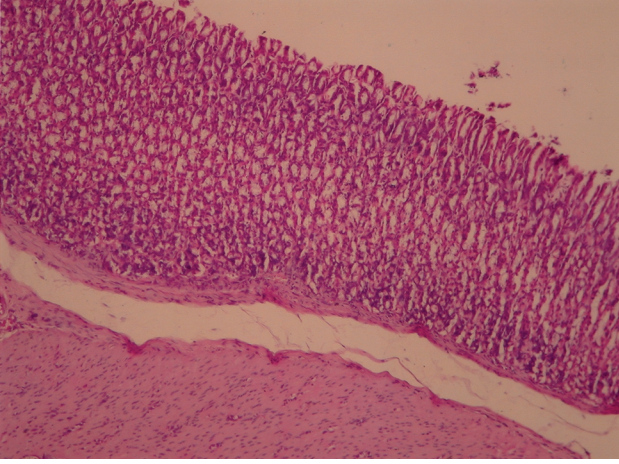
Grup 1'de makroskopik ve mikroskopik mide lezyonu saptanmadı. Grup 2'de makroskopik olarak 2 ratta hafif hiperemi ve 1 ratta erozyonlar saptandı. Bu grupta histolojik olarak 5 ratta (%50) akut gastrit (yoğun nötrofil infiltrasyonu) saptanırken (Resim 1) ATIII verilen grupta (Grup 3) hiçbir ratta makroskopik ve mikroskopik lezyon gözlenmedi (p<0.05) (Tablo 1) (Resim 2).

Tablo 1. Yanık oluşturulan ratlarda mide mukoza lezyonları

Mide Lezyonu	Grup I	Grup II	Grup III
Makroskopik	% 0	% 30	% 0
Mikroskopik	% 0	% 50	% 0



Resim 1. Yanık oluşturulan ratlarda mide mukozasındaki akut gastrit örneği



Resim 2. Yanık oluşturulan ve ATIII verilen ratlarda mide mukozası

TARTIŞMA

Bu çalışma vucut yüzeyinin yaklaşık %30'unu içeren tam kat yanık oluşturulan ratların mide mukozasında hiperemi ve erozyon oluşturduğunu göstermektedir. Ayrıca bundan daha önemlisi çalışma grubunda histolojik incelemede saptanan yoğun mukozal nötrofil infiltrasyonudur.

Son yıllarda gastrik mukozal erozyon ve ülserlerin etyolojisi ve patofizyolojisini ortaya koymaya çalışan birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar daha çok safra asidi, alkol, hipertonic solusyonlar gibi hasar yapıcı maddenin intragastrik olarak infüzyonu şeklindedir (10-12). Ayrıca cold immersion, liquid restrain gibi stress oluşturma ve nihayetinde hemorajik şok gibi çalışmalar yapılmıştır (5, 13). Yanık oluşturularak yapılan çalışmalar daha yenidir ve bu konudaki çalışmalar artarak devam etmektedir.

Strese bağlı gastrik mukozal lezyonların patofizyolojisinde birçok faktör bir arada rol oynamaktadır. Bunu tek faktör ile açıklamak olası değildir. Stres ülserleri oluşmasında ana mekanizma hipotansiyon, hipoksi ve sepsis ile agreve olan gastrik mukozal iskemidir. Bu konuda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun da rolü olduğu düşünülmektedir (14). Serbest oksijen radikallerinin önemli bir kaynağında polimorf lökositlerdir. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır. Hücre membranları çok miktarda lipid içerir. Ve serbest oksijen radikallerinin bulunduğu ortamda hücre nekrozu gelişmektedir. Yanık travması sonrasında gastrik mukozal kan akımının 15 dakika içinde azaldığı-

nı bu dönemde arterioler kontraksiyon olduğu ve venüllerde lökosit yığılmasını arttığı gösterilmiştir (15, 16).

Yanık travmasını takiben splanknik alanda kan azalmaktadır. Splanknik kan akımı yaklaşık 4. saatte en alt düzeye inmekte ve sonrasında gideerek artarak 24. saatte bazal değerlere ulaşmaktadır. Yanıkta splanknik alandaki bu kan akımı azalması, aşırı sıvı verme tedavilerine rağmen oluşmaktadır. İskemi-reperfüzyon travmasında özellikle yanıkta TXA₂ sorumlu tutulmaktadır. Yanıkta TXA₂ düzeyindeki artış olurken PGI₂ düzeyinde değişiklik olmamaktadır (17). Ayrıca yanıklı hastalarda yine endotel kaynaklı olan endotelin-1 in belirgin olarak arttığı ve vasokonstriksiyon yaparak mikrosirkulasyonda bozulmaya yol açtığı neticede ödem, vaskuler tromboz ve sonucunda da doku nekrozuna giden olayları başlattığı gösterilmiştir (18). Ratlarda yapılan çalışmalarda endotelinin gastrik vaskuler tonusu etkilediği ve bu yolla injuriye yatkınlığı artırdığı, endotelin reseptör antagonistlerinin mukozal lezyonları önlediği gösterilmiştir (19).

Antithrombin III (ATIII) major antikoagülan olup kan koagülasyon kaskadında thrombin gibi serin proteazların aktivitesini inhibe etmektedir (6). Ayrıca ATIII'ün endotel hücrelerinin yüzeylerindeki glycosaminoglycan'larla etkileşerek PGI₂ salınımını artırdığı gösterilmiştir ve bu yolla anti-inflamatuvar etki de göstermektedir (7, 8, 20). PGI₂ lökosit aktivasyonu, platelet agregasyonunu güçlü şekilde inhibe eder ayrıca vasodilatatör etkiside vardır. Bu özellikleri ile normal mikrosirkülasyonun idamesini sağlamaktadır (9). Lökositlerin aktifleşmesi ARDS, ve DIC'da olduğu gibi organ yetmezliğinde önemli rol oynamaktadır (21). TNF- α ve interlökin-1 gibi sitokinler ve diğer inflamatuvar maddeler lökositlerden salınarak endotel hücrelerinde hasara yol açarak mikrosirkülasyonu bozmaktadır (22). ATIII'ün ratlarda intravenöz olarak verilmesi PGI₂'nin stabil bir metaboliti olan 6-keto-prostaglandin F1- α 'nın plazma düzeyini artırdığı gösterilmiştir (20).

Çalışma sonuçlarımıza göre, yanıkta ATIII verilmesi ile gastrik mukozal lökosit infiltrasyonunun önlenebileceğini gösterdik. Spekülatif düşünecek olursak ATIII'ün fonksiyonunu mikrosirkülasyona etki yanında, PGI₂ bağlı lökosit aktivasyon inhibisyonu yoluyla da oluşturduğu söylenebilir. Bu etki ile lökositlerin sitokin veya serbest oksijen radikallerinin artmasıyla yaptığı lipid peroksidasyonu ve hücre nekrozunun önüne geçerek

mukozal hasarı önleyebileceği düşüncesindeyiz. Ancak çalışmamızda bu parametrelere bakılmamış olup bu konuda ileri deneysel çalışmalar yapılarak etki mekanizmasının net olarak ortaya konulması faydalı olacaktır.

Sonuç: Yanık oluşturulan ratlarda gastrik mukozal lezyonlar daha çok nötrofil infiltrasyonu (akut gastrit) şeklinde ortaya çıkmaktadır. AIII ile bu lezyonlar önlenmektedir. ATIII gastrik mukozal lezyonları önlemek amacıyla yanıktan hemen sonra erken dönemde kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Richardson RS, Norton LW, Sales JEL. Gastric blood flow in endotoxin-induced stress ulcer. *Arch Surg* 1973; 106: 191-4.
2. Kivilaakso E, Silen W. Pathogenesis of experimental gastric mucosal injury. *N Engl J Med* 1979; 301: 364-7.
3. Craja AJ, Mcalhay JC, Pruitt Jr BA. Gastric acid secretion and acute gastroduodenal disease after burns. *Arch Surg* 1976; 111: 243-5.
4. Skolleborg KC, Gronbech JE, Abyholm FE, et al. Acute erosions of the gastric mucosa in burned rats: effect of gastric acidity and fluid replacement. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg* 1990; 24: 185-92.
5. Cho CH, Koo MWL, Garg GP, et al. Stress induced gastric ulceration; Its aetiology and clinical implications. *Scand J Gastroenterol* 1990; 27: 257-62.
6. Abilgaard UA. A review of antithrombin III. In the physiological inhibitors of coagulation and fibrinolysis. D. Collen, B. Wiman, W. Verstaete (ed.), pp19-29, Elsevier, Amsterdam (1979).
7. Yamauchi T, Umeda F, Inoguchi T, et al. Antithrombin III stimulates prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163: 1404-11.
8. Horie S, Ishii H, Kazama M. Heparin like glycosaminoglycan is a receptor for antithrombin III dependent but not thrombin dependent prostacyclin production in human endothelial cells. *Thromb Res* 1990; 59: 895-904.
9. Uchiba M, Okajima K. Antithrombin III (ATIII) prevents LPS- induced pulmonary vascular injury; novel biological activity of ATIII. *Semin Thromb Hemost* 1997; 23: 583-90.
10. Rossam AC, Wallence JL, Whittle BRJ. Potent ulcerogenic actions of platelet-activating factor on the stomach. *Nature* 1986; 319: 54-6.
11. Davenport HW. Gastric mucosal hemorrhage in dogs. Effects of acids, aspirin, and alcohol. *Gastroenterology* 1969; 56: 439-49.
12. Ritchie Jr WP. Acute gastric mucosal damage induced by bile salts, acid and ischemia. *Gastroenterology* 1975; 68: 699-707.
13. Robert A, Nezmis JE, Lancaster C, et al. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCL, NaOH, hypertonic NaCL, and thermal injury. *Gastroenterology* 1979; 77: 433-43.
14. Overmier JB, Murison R, Ursin H. The ulcerogenic effect of a rest period after exposure to water restrain stress rats. *Behav Neural Biol* 1986; 46: 372-82.
15. Yoshikawa T, Naito Y, Ueda S, et al. Role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of gastric mucosal lesions in rats. *J Clin Gastroenterol* 1990; 12: 65-71.
16. Yoshida M, Wakabayashi G, Otani Y, et al. Active oxygen species generation by circulating leucocytes and gastric submucosal microcirculatory disturbances in the early period after thermal injury. *J Clin Gastroenterol* 1995; 21: 87-92.
17. Yoshida M, Ishikawa H, Kitahora T, et al. Rebamipide attenuates gastric microcirculatory disturbances in the early period after thermal injury in rats. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 148s-53s.
18. Lelcuk S, Alexander F, Kobzic L, et al. Prostacyclin and thromboxane A2 moderate postischemic renal failure. *Surgery* 1985; 98: 207-12.
19. Huribal M, Cunningham ME, D'Aiuto ML et al. Endothelin-1 and PGE2 levels increase in patients with burns. *J Am Coll Surg* 1995; 180: 318-22.
20. Battal NM, Hat Y, Ito O, et al. Reduction of burn-induced gastric mucosal injury by an endothelin receptor antagonist in rats. *Burn* 1997; 23: 295-99.
21. Okajima K, Uchiba M. The anti-inflammatory properties of antithrombin III: New therapeutic implications. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24: 27-32.
22. John RS, Dorinsky PM. Immunologic therapy for ARDS, septic shock and multiple organ failure. *Chest* 1993; 103: 932-43.
23. Stephans KE, Ishizuka A, Wu ZH, et al. Granulocyte depletion prevents tumor necrosis factor-mediated acute lung injury in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 1300-7.