

# Sıçanlarda Non-steroid Anti-inflamatuar İlaçla Oluşan Gastrik Hasarlanmanın Önlenmesinde Farklı Ajanların Karşılaştırılması

## COMPARING VARIOUS AGENTS IN RATS FOR PREVENTING GASTRIC DAMAGE CAUSED BY NON-STEROID ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

Dr. Sezin AŞIK AKMAN,<sup>a</sup> Dr. Raşit V. YAĞCI,<sup>b</sup> Dr. Gülperi ÖKTEM,<sup>c</sup> Dr. Meral BAKA<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Pediyatrik Gastroenteroloji Hepatoloji Beslenme Bölümü, Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi,

<sup>b</sup>Pediyatrik Gastroenteroloji Hepatoloji Beslenme BD, <sup>c</sup>Histoloji ve Embriyoloji AD, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İZMİR

### Özet

**Amaç:** Non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİ), metabolitlerinin neden olduğu topikal zararlanma, mide mukusunun hidrofobitesinin azalması ve prostaglandin sentezinin supresyonu ile gastrointestinal sistem mukozasında zararlanmaya neden olurlar. Mukozanın bu etkilerden korunmasında profilaktik ajanların kullanımı söz konusudur. Çalışmamızda, naproksen ve HCl asit ile midelerinde hasarlanma oluşturulan sıçanlarda, bu hasarın önlenmesinde glutamin, arjinin, karnitin ve ranitidin etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmaya alınan sıçanlar biri kontrol grubu olmak üzere 5 gruba ayrılarak, her gruba profilaktik ajanlar 10 gün intragastrik yoldan uygulandı (Ranitidin: 50 mg/kg, glutamin: 750 mg/kg, arjinin: 300 mg/kg, karnitin: 50 mg/kg). İkinci aşamada, mide mukozasında hasarlanma oluşturulması için, önce 40 mg/kg dozda naproksen sodyum, ardından 0.5 M HCl asit (10 cc/kg) verildi. Sakrifikasyondan sonra, mide materyalleri makroskopik, histolojik ve histomorfometrik olarak incelendi. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar, Mann-Whitney U, Fischer exact, tek yönlü Anova testleri ile analiz edildi, p $\leq$  0.05 olan değerler anlamlı kabul edildi.

**Bulgular:** Makroskopik incelemede, profilaksi verilmeyen sıçanlarda mukozada %60 oranında ülser, %40'ında konjesyon ve ödem saptandı. Ranitidin ve glutamin grubundaki sıçanların sırasıyla, %22.2 ve %20'sinde lezyon saptanmazken, bu gruplarda geniş çaplı ülsere de rastlanmadı. Ancak profilaktik ajanlar arasında makroskopik bulgular yönünden istatistiksel farklılık bulunmadı (p> 0.05). Histolojik değerlendirmede, ranitidin alan grubun %28'inde, kontrol grubunda ise %4 oranında lezyon olmadığı belirlendi (p< 0.05). Kontrol grubu ile profilaksi grupları arasında histomorfometrik ölçümlerin ortalaması bakımından istatistiksel farklılık bulunmadı, ranitidin ile arjinin grubu arasında histomorfometrik açıdan farklılık görüldü (p< 0.05).

**Sonuç:** Sıçanlarda mide mukozası hasarının önlenmesinde profilaktik ajanların kullanılması ile histolojik lezyonların daha az geliştiği, morfometrik açıdan en az hasarın ranitidin grubunda olduğu gösterilmiştir. Benzer araştırmaların biyokimyasal mediyatörler de çalışılarak genişletilmesi, özellikle NSAİ ilaçların yaygın kullanıldığı hasta gruplarında tedaviden yararlanımı artıracaktır.

**Anahtar Kelimeler:** NSAİ ilaçlar, gastrik ülser, histolojik sınıflandırma, sıçan

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2005, 25:786-794

### Abstract

**Objective:** Non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) may cause damage in the gastrointestinal system mucosa due to topical harm produced by metabolites as well as a decrease in the hydrophobicity of the stomach mucosa and suppression of prostaglandin synthesis. Protecting the mucosa from these effects means using prophylactic agents. In our study, we aimed to compare the effects of L-glutamine, L-arginine, L-carnitine and ranitidine in preventing these effects among rats whose stomachs were damaged after intake of naproxen and hydrochloric acid (HCl).

**Material and Methods:** The rats included in this study were divided into five groups one of which was the control group and prophylactic agents were administered through the intragastric route to all groups for 10 days (Ranitidine: 50 mg/kg, glutamine: 750 mg/kg, arginine: 300 mg/kg, carnitine: 50 mg/kg). In the second stage 40 mg/kg naproxen sodium followed by 0.5 M HCl (10 cc/kg) were administered to the rats in order to produce damage in the stomach mucosa. After sacrifice, stomach materials were examined macroscopically, histologically and histomorphologically. Differences between groups were analyzed using the Mann-Whitney U, Fischer's exact and one-way Anova tests. Statistical significance was set at p $\leq$  0.05.

**Results:** Macroscopic examination revealed ulcerous mucosa in 60% and congestion as well as edema in 40% of rats not taking prophylactic agents during the test period. No lesion was present in 22.2% and 20% of the rats taking ranitidine and L-glutamine respectively, a wide-scale ulcer case was not discovered. On the other hand, no statistically significant difference in terms of macroscopic findings were determined between prophylactic agents (p> 0.05). Histological examination did not reveal any lesion in 28% of the rats in the ranitidine group and 4% of the control group (p< 0.05). Furthermore, we could not find any statistical difference between the control and prophylaxis groups in terms of average histomorphological measurements. However, significant differences between ranitidine and arginine groups appeared during histomorphological examinations (p< 0.05).

**Conclusion:** We concluded that histological lesions developed less frequently in rats when they were given prophylactic agents to prevent damage in their stomach mucosa; the least damage in terms of morphological evaluation occurred in the ranitidine group. Further studies on this field, including biochemical mediators are required to accomplish higher rates of treatment in patients who widely depend on the intake of NSAIDs.

**Key Words:** Anti-inflammatory agents, non-steroidal, stomach ulcer, staining and labeling, rats

Geliş Tarihi/Received: 06.12.2004

Kabul Tarihi/Accepted: 10.10.2005

**Yazışma Adresi/Correspondence:** Dr. Sezin AŞIK AKMAN  
Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi,  
Pediyatrik Gastroenteroloji Hepatoloji Beslenme Bölümü,  
İZMİR  
dr.akman@superonline.com

Copyright © 2005 by Türkiye Klinikleri

**N**on-steroid anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİ)'nin kullanımına bağlı non-spesifik gastrointestinal (Gİ) patolojilerin oluşabileceği bilinmektedir. NSAİ alan hasta gruplarında %10-20 oranında dispepsi geliştiği, yetişkinlerde

NSAİ'e sekonder üst Gİ sistem kanaması nedeni ile hospitalize edilen hastalarda mortalite oranının %5-10 olarak saptandığı gösterilmiştir.<sup>1</sup>

Gİ mukoza hasarlanmasının patogeneğinde, mide mukusunun hidrofobitesinin azalması, NSAİ metabolitlerinin biliyer ekskresyonu ile duodenogastrik reflüsünün yol açtığı topikal zararlanma ile prostaglandinlerin (PG) rolü üzerinde durulmaktadır. NSAİ ilaçlar siklooksijenaz enzimi inhibisyonu ve PG sentezinin supresyonuna neden olurlar. PG'lerin inhibisyonu, mide epitelindeki mukus, bikarbonat salınımını, mukoza kan akımı ve direncini azaltmaktadır.<sup>1,2</sup> Endotelde ICAM-1'in ekspresyonunun artışı ile mide vasküler endotelinde nötrofillerin kümelenmesi de, serbest O<sub>2</sub> radikalleri ve proteazların salınımına yol açarak mukoza hasarlanmasına ve ülser gelişimine katkıda bulunmaktadır.<sup>2-4</sup>

Hastaların çoğunluğunda, mukozal hasarlanma yüzeysel ve kendini sınırlayıcı olmasına karşın, bazı hastalarda subepitelyal hemorajiler, erozyonlar ve ülserler gelişmektedir. NSAİ'lerin kullanımına bağlı oluşan Gİ komplikasyonların prevalansının azaltılması için, mukoza hasarının önlenmesine yönelik çalışmalar gündemdedir. Önerilen yöntemlerden biri de NSAİ ilaç tedavisi sırasında, birlikte H<sub>2</sub> reseptör antagonisti, PPI, sukralfat gibi ajanların tedaviye eklenmesidir.<sup>1</sup>

Deney hayvanlarında, özellikle sıçanlarda, değişik ajanların gastrik mukozadaki koruyucu etkilerinin bildirildiği araştırmalar yapılmıştır. L-karnitinin mide mukoza bariyerini güçlendirdiğini belirten çalışmaların yanı sıra, stres veya etanolla indüklenmiş gastrik zedelenmede NO prekürsörü olan L-arjininin mukoza hasarını önlediğini gösteren araştırmalar da bulunmaktadır.<sup>5-9</sup> Farelerin diyetlerine eklenen L-arjinin ve L-karnitin hipoksiye bağlı oluşturulan nekrotizan enterokolitte bağırsak mukozasında zararlanmayı azalttığı da gösterilmiştir.<sup>10</sup> Aminoasit yapısındaki bir başka ajan olan glutaminin de mide mukozasının direncini arttırdığı ve sitoprotektif etkisi ile gastroduodenal mukozada koruyucu etkili olduğu da bilinmektedir.<sup>11,12</sup> Ranitidin ise NSAİ'lere bağlı olarak gelişen gastrik ve duodenal lezyonların iyileştirilmesindeki etkinliği kanıtlanmış bir H<sub>2</sub> reseptör antagonistidir.<sup>13</sup>

NSAİ ilaçlara bağlı Gİ hasarın ve ülser gelişiminin profilaksisinde, ranitidin, glutamin, karnitin ve arjinin kullanımı ile ilgili, hayvan çalışmaları olmakla birlikte bu ajanların karşılaştırılması hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada amaç, NSAİ'lere bağlı akut gastrik mukozal hasarın önlenmesinde, glutamin, arjinin, karnitin ve ranitidin profilaktik etkilerinin makroskobik ve histolojik olarak karşılaştırılmasıdır.

## Gereç ve Yöntemler

Çalışmamızda, sıçan mide mukozasında NSAİ ilacın akut toksisitesi ile ilgili Holzer ve ark.nın deneysel modeli esas alınmıştır.<sup>14</sup>

### Çalışma Düzeni

Erkek, albino Wistar, ağırlıkları 180-200 gr arasında değişen 50 sıçan çalışmaya alındı. Sıçanlar yetiştirme ortamlarından deney merkezine alındıktan sonra, hem yeni ortama alışmaları, hem de enfeksiyon gelişme olasılığına karşın 1 hafta boyunca gözetim altında tutuldular. Deney ortamının ortalama ısısı 23-24°C olarak ayarlandı. Standart yemle (sığırcı besiyemi, Tarih-Yemta)\* beslenen ve birinci haftanın sonunda sağlıklı olarak değerlendirilen sıçanlar çalışmaya dahil edildi. NAP tarafından yayınlanan hayvan haklarının korunması hakkındaki esaslara bağlı kalındı (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996). Çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu'nun 2003-18 nolu kararı ile onaylandı. Çalışma 2 aşamada gerçekleştirildi. Sıçanlar, biri kontrol grubu olmak üzere, her bir gruba farklı profilaksi uygulanması planlanarak 5 gruba ayrıldı. Ranitidin profilaksi grubundaki ratlardan biri gastrik hasarlanma oluşturulmadan önce kaybedildi. Araştırma 49 sıçan ile tamamlandı.

**I. Profilaksi:** İlk aşamada, grupları oluşturan ajanların her birinin etken maddeleri elde edildi (Haxel, Almanya/İlsan-İltaş, Türkiye). İlaçlar

\*Besiyemin içeriği:

Temel besin maddeleri	(%)		
Kuru madde:	88	Kalsiyum:	1-2
Ham protein:	16	Fosfor:	0.5
Ham sellüloz:	14	Sodyum:	0.3-0.6
Ham kül:	9	NaCl:	1
HCl'de çözülmeyen kül:	1	Metabolik enerji:	2525 kcal /kg

hassas terazide tartılarak dozları ayarlandı. Ranitidin, arjinin, karnitin 10 cc distile suda, glutamin 10 cc serum fizyolojikte çözündürüldü. Kontrol grubuna da 10 cc serum fizyolojik verildi. Elde edilen ilaç çözeltileri 10 gün boyunca, aynı dozda ve aynı araştırmacı tarafından oral gastrik sonda (infant beslenme sondası: Romsons, no: 0.5) ile uygulandı. Grupları oluşturan sıçanlara NSAİ (naproksen sodyum) kullanımı öncesinde profilaktik olarak verilen ajanlar ve dozları Tablo 1'de belirtilmiştir:

**II. NSAİ ilaç ile mukoza hasarının oluşturulması:** Profilaktik ajanın son dozunun verilmesinden 6 saat sonra, NSAİ uygulanması planlandı. Sıçanlar, beşerli gruplar halinde, altı delikli özel hazırlanmış tel kafeslere yerleştirildiler ve aç bırakıldılar. NSAİ ilacın uygulanmasından 1 saat öncesine dek su serbest bırakıldı. Bir gün aç bırakılan ve dışkılarını yememeleri için kafeslerinin tabanına 2-3 cm yükseklikte tel ızgaralar yerleştirilen sıçanlara NSAİ olarak serum fizyolojikte çözündürülen naproksen sodyum uygulandı. Naproksen dozu önceki çalışmalara dayanılarak 40 mg/kg dozda ayarlandı.<sup>14</sup> Solüsyon infant nazogastrik sonda ile sıçanlara verildi. İki saat sonra 0.5 M HCl (10 cc/kg) aynı yolla uygulandı. Bu işlemden 1 saat sonra, tüm sıçanlar peritona uygulanan yüksek doz pentobarbital sonrası sakrifiye edilerek mideleri çıkarıldı. Büyük kurvaturdan kesilerek su ile yıkandı. Makroskopik olarak her sıçan için hasarlanmış-ülser alanlar saptanıp kaydedildi. Çıkarılan mideler ayrı ayrı solüsyonlara alınıp histolojik preparatlar için kesitler alındı. Sakrifiye edilen sıçanlar, enfekte atık merkezine gönderildi. Elde edilen materyaller makroskopik, histopatolojik ve histomorfometrik yönden ince-

**Tablo 1.** NSAİ kullanımı öncesi profilakside kullanılan ajanlar.

Grup	Ajan	Doz (mg/kg)
1	Ranitidin	50
2	Glutamin	750
3	Arjinin	300
4	Karnitin	50
5	Kontrol (Serum fizyolojik)	

lendi.

Gastrik mukozal hasarın makroskopik incelemesi ve skorlanmasında aşağıdaki skorlama sistemi kullanıldı:<sup>5</sup>

0 = Normal

1 = Konjesyon ve ödem

2 = Noktasal ülserler

3 = Noktasal ülserler ve <3 mm olan küçük ülserler

4 = >3 mm'den büyük çaplı bir veya daha fazla ülser.

Histolojik değerlendirme için mide materyalleri fiksatif solüsyonda (Formaldehit + Bouin solüsyonu) tespit edildi. Hazırlanan parafin bloklarından (Leica RM 2145 model mikrotomda) elde edilen 6 mikronluk kesitler lam üzerine alındı. Hematoksilin-Eozin ile boyandı. Kesitler öncelikle ışık mikroskobu ile değerlendirildi (Olympus B x 50). Gastrik mukozal hasar ve ülser oluşumu değerlendirildi. Lezyonların 3 tipe ayrıldığı skorlama sistemi kullanıldı.<sup>15</sup>

Tip 1: Lümen yüzeyinde, mukoza hücrelerinin lizisi, gastrik pit hücrelerde hasarlanma yok.

Tip 2: Mukoza yüzeyi ve gastrik pitlere kadar uzanan lamina propriyanın üst bölümünde hasarlanma, mide bez hücrelerinde hasar yok.

Tip 3: Tip 2'deki bulgulara ek olarak, lamina propriyanın alt bölümünde ve mide bez hücrelerinde de hasarlanma var (tüm mukoza katlarına yayılım söz konusu).

Naproksen sodyum ve HCl ile mide mukozalarında hasarlanma oluşturulan sıçanlarda lezyonların tiplerinin yanı sıra, midedeki lokalizasyon yeri de araştırıldı.

Natale adlı araştırmacının deneysel modeli örnek alınarak planlanan histomorfometrik incelemede, herbir sıçandan üç kesit alınarak ölçüm yapıldı (Ranitidin grubu 9 sıçan x 3 = 27, glutamin grubu 10 sıçan x 3 = 30, arjinin grubu 10 sıçan x 3 = 30, karnitin grubu 10 sıçan x 3 = 30, kontrol grubu 10 sıçan x 3 = 30: Toplam 147 kesit).<sup>15</sup>

Mukoza kalınlığındaki değişiklik tüm gruplar-

da morfometrik olarak tek araştırmacı tarafından değerlendirildi. Kontrol ve deney gruplarında gastrik mukozanın total yüzey alanı ve yüzey dansitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$S_v = \frac{2 \cdot \Sigma I_i}{l/p \cdot \Sigma P_i}$$

S<sub>v</sub> = Birim volümdeki yüzey alanı

ΣI = Sayılan intersept toplamı

P x I = Toplam nokta sayısı x intersept uzunluğu

Hasarlı mide mukozasının yüzey alanının mikrometrik skala ile değerlendirilmesi esasına dayanan bu yöntemde yüzey alanındaki birim değer intersept olarak tanımlandı. Oküler mikrometrik skala ile lümen yönünden hasarlı ve total mukoza alanlarının uzunluğu ölçüldü. Bu ölçümde her birimi intersept olarak adlandırılan (Periplan GF 12.5 x 18 M, 200 alt üniteye bölünmüş) ölçüm cetvelleri kullanıldı.

Elde edilen veriler SPSS istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Değerlendirmelerde ki kare, Mann-Whitney U, tek yönlü Anova ve Post hoc çoklu karşılaştırma testleri uygulandı. Gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar ve oluşturulan gruplarda ikiden fazla değişkenin derecelendirilmesi karşılaştırıldığında, Mann Whitney U, histomorfometrik bulguların değerlendirilmesinde, tek yönlü Anova testleri kullanıldı, gruplar arasındaki farkın hangi ikili gruptan kaynaklandığı Post hoc çoklu karşılaştırma testi uygulandı, p ≤ 0.05 olan değerler anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Mide mukozasındaki lezyonlar makroskobik, histopatolojik ve histomorfometrik olarak değer-

lendirildi. Lezyonların makroskobik olarak gruplardaki dağılımı Tablo 2’de görülmektedir:

### Makroskobik bulgular:

1. Kontrol grubunu oluşturan sıçanların tümünün gastrik mukozalarının hasarlandığı ve 6 sıçanda (%60) ülser geliştiği saptandı.

2. Gruplar makroskobik lezyonlar açısından kıyaslandığında, kontrol grubundaki sıçanların tümünde midede lezyon gözlenirken, profilaksi alan sıçanların %87.1’inde lezyon oluştuğu belirlendi. Ancak profilaksi alan grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel farklılık bulunamadı (p > 0.05).

3. Normal değerlendirilen sıçan sayısı ranitidin grubunda en fazla iken, arjinin ve kontrol grubunda normal sıçan saptanmadı. Ülser gelişimi değerlendirildiğinde, ranitidin ve karnitin gruplarında sıçanlarda ülser olmadığı, arjinin grubunda 2 (%20) ve kontrol grubunda 3 (%30) sıçanda ülser geliştiği gözlemlendi.

4. Profilaksi alan 4 grup kendi arasında karşılaştırıldığında, gruplar arasında makroskobik bulguların varlığı-derecesi açısından anlamlı bir fark olmadığı belirlendi (p > 0.05).

Her bir etken maddenin verildiği 4 farklı grupta ve ilaç uygulanmayan kontrol grubunda midede oluşan histolojik lezyonların değerlendirmesi Tablo 3’te görülmektedir:

### Histopatolojik bulgular:

1. Toplam 24 sıçanda mide mukozasında lezyon (49/24, %48.97) saptandı. Lezyonların dağılımı, korpusta %66.66, antrumda ise %33.33 olarak belirlendi.

**Tablo 2.** Lezyonların makroskobik değerlendirilmesi.

İlaç	n*	Normal n* (%)	Konjesyon+ödem n* (%)	Noktasal ülser n* (%)	Ülser(<3 mm) n* (%)	(>3 mm) n* (%)
Ranitidin	9	2 (%22.2)	4 (%44.44)	3 (%33.33)	0	0
Glutamin	10	2 (%20)	5 (%50)	2 (%20)	1 (%10)	0
Arjinin	10	0	6 (%60)	2 (%20)	1 (%10)	1 (%10)
Karnitin	10	1 (%10)	8 (%80)	1 (%10)	0	0
Kontrol	10	0	4 (%40)	3 (%30)	2 (%20)	1 (%10)

\*Örnek sayısı

Gruplar arasında oluşan makroskobik lezyonlar bakımından kikare testi ile yapılan değerlendirmede istatistiksel farklılık saptanmadı (p > 0.05).

**Tablo 3.** Lezyonların histopatolojik skorlaması.

İlaç	n*	Lezyonsuz n* (%)	Tip 1 n* (%)	Tip 2 n* (%)	Tip 3 n* (%)
Ranitidin	27	3 (%11.11)	3 (%11.11)	0	21 (%77.77)
Glutamin	30	6 (%20)	6 (%20)	0	18 (%60)
Arjinin	30	6 (%20)	6 (%20)	3 (%10)	15 (%50)
Karnitin	30	6 (%20)	6 (%20)	0	18 (%60)
Kontrol	30	6 (%20)	6 (%20)	15 (%50)	3 (%10)

\*Örnek sayısı.

2. Kontrol grubundaki sıçanların % 50'sinde en ağır lezyon tipi olan tip 3 lezyon görülürken, kontrol grubu dışında sadece arjinin grubunda %10 oranında tip 3 lezyon saptandı. Bu grupta sıçanların %90'ında tip 1, tip 2 veya tip 3 şeklinde mukoza hasarı gözlemlendi, mukoza hasarlanması görülmeyen sıçan sayısının azlığı dikkat çekici idi (%10).

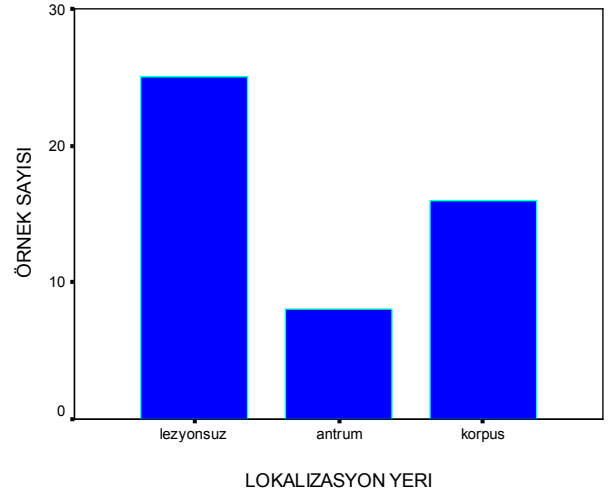
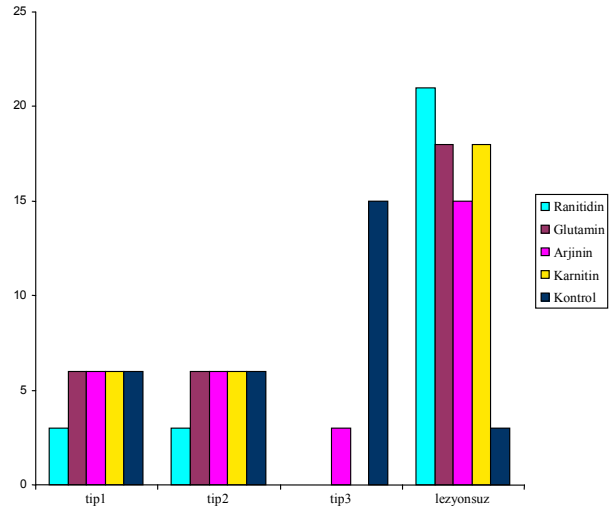
3. Profilaksi yapılan sıçanlarda, tip 1 ve 2 hasarlanmanın %46.66 oranında, en şiddetli lezyon olan tip 3'ün ise, %6.66 oranında olduğu belirlendi.

4. Profilaksi alan grup, kendi arasında hasarlanmanın histopatolojik değerlendirmesi bakımından Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, farklı ilaçların uygulandığı 4 grup arasında istatistiksel anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ( $p > 0.05$ ).

5. Ranitidin ile profilaksi yapılan grupta gastrik mukoza hasarı olmayan (lezyonsuz) sıçan sayısı, diğer gruplardan farklılık göstermekte idi (Ranitidin grubunda lezyonu olmayan sıçan sayısı %77.77 iken, arjinin grubunda %50, kontrol grubunda %10 saptandı). Kontrol grubu ile ranitidin grubu histolojik olarak lezyonun olmaması bakımından kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ( $p < 0.05$ ).

Gruplardaki lezyonların lokalizasyonları Şekil 1'de, gruplar arasındaki histolojik farklılıklar Şekil 2'de gösterilmiştir:

Sıçanların yaklaşık yarısında (%48.9) histolojik düzeyde hasar gözlenirken, lezyonların gastrik lokalizasyonları incelendiğinde, tip 1 ve 2 lezyonların korpusunda (%77.7), tüm mukoza katmanlarında hasarlanmanın görüldüğü tip 3 lezyonun ise antrumda daha fazla oranda (%66.6) saptandığı belirlendi.

**Şekil 1.** Lezyonların lokalizasyonlarının dağılımı.**Şekil 2.** Lezyonların histolojik sınıflandırılması.

Histomorfometrik değerlendirme sonuçları Tablo 4'te gösterilmiştir:

Grupların ortalama histomorfometrik değerlendirme sonuçları Tablo 5'te verilmiştir.

#### Histomorfometrik bulgular:

1. Mide mukoza materyallerinin morfometrik incelemeleri yapıldığında, ortalama  $\pm$  standart sapma değerinin  $6.15 \pm 1.02$  (min: 3.8-max: 7.2) olduğu saptandı.

2. Kontrol grubundaki sıçanların histomorfometrik sonuçlarının ortalaması 5.78 iken, profilaksi uygulanan diğer grupların morfometrik ortalaması 6.26 olarak bulundu ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 4.** Lezyonların histomorfometrik olarak değerlendirilmesi.

Sıçan no	Ranitidin	Glutamin	Arjinin	Karnitin	Kontrol
1	5.8	5.9	4.3	5.04	6
2	7	5.6	5.8	5.68	6.3
3	7.1	5.4	5.8	5.8	7.1
4	7.2	5.2	7.04	3.8	5.7
5	6.9	7.1	7	7.1	6.3
6	7.2	7	3.8	7.2	6
7	7	7.2	5.3	6.9	5.9
8	7.2	6.8	5.3	7.2	4.3
9	7.1	7.1	4.8	7	6
10	--	7	4.9	7.1	4.2

Sütunlarda belirtilen gruplardaki, örneğin 1.sütunda/ranitidin grubundaki 1 nolu sıçanın mide mukozasının histomorfometrik ölçümü 5.8 iken, 4. sütundaki/ karnitin grubunun 4 no.lu sıçanında bu ölçüm 3.8 olarak belirlenmiştir.

**Tablo 5.** Histomorfometrik değerlendirmenin ayrıntılı sonuçları.

İlaç	Ortalama $\pm$ standart sapma	Medyan	Minimum	Maksimum
Ranitidin	6.94 $\pm$ 0.44	7.1	5.8	7.2
Glutamin	6.43 $\pm$ 0.8	6.9	5.2	7.2
Arjinin	5.4 $\pm$ 1.05	5.3	3.8	7
Karnitin	6.28 $\pm$ 1.16	6.95	3.8	7.2
Kontrol	5.78 $\pm$ 0.89	6	4.2	7.1

3. Gruplar arasındaki farklılığın one way ANOVA testi ile, gruplar arasında farkın hangi ikili gruptan kaynaklandığının, Post hoc çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmesi sonucunda:

Ranitidin, glutamin, arjinin ve karnitin gruplarındaki sıçanların histomorfometrisi kıyaslandığında, ranitidin ile arjinin arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p < 0.05$ ).

### Tartışma

NSAİ ilaçların Gİ sistemde oluşturduğu ağrı, kanama gibi yan etkilerin varlığı uzun yıllardan beri bilinmektedir. Farklı hasta popülasyonlarında kullanım sonrası yaygın ve non-spesifik Gİ yan etkiler gözlenmektedir.<sup>1,16,17</sup> NSAİ kullanımı sırasında dispeptik yakınmaların oranının %5-50 arasında saptandığı çalışmalar bulunmaktadır. ABD'de 1997 yılının mortalite verilerine göre, yetişkinlerde ölüm nedenleri sıralamasında NSAİ toksisitesi 3. sıradadır. NSAİ'lere bağlı üst Gİ sistem kanamalarında hospitalize edilen hasta grubunda mortalite oranının %5-10 arasında olması da

dikkat çekicidir.<sup>17-19</sup> NSAİ ilaç kullanan hastalarda akut ve kronik kullanımda, mide ve duodenum ülserleri oluşum riskinin arttığı yetişkinlerde yapılan çok sayıda epidemiyolojik ve endoskopik araştırmada kanıtlanmıştır.<sup>1,16,20,21</sup> Vasküler endotelde adezyon moleküllerinin ekspresyonlarındaki değişiklikler, nötrofillerin etkilenmesi sonucunda, serbest O<sub>2</sub> radikalleri ve proteazların salınımı ülser gelişimine neden olmaktadır.<sup>2,3</sup> Makrofaj migrasyon inhibitör faktör gibi mediyatörlerin de ülser patogenezinde önemli rol oynadığı bilinmektedir.<sup>22</sup> Postmortem çalışmalarda, ölümlerinden önceki dönemde NSAİ kullanan hastalarda ve kullanılmayan kontrol grubunda mide ve duodenum ülseri sıklığı, sırasıyla %21.7 ve %12.3 bulunmuştur.<sup>18</sup>

Yaygın kullanımı ve ciddi sorunlara yol açması nedeni ile NSAİ'lere bağlı gelişen Gİ sistem komplikasyonlarının önlenmesi, önemli bir halk sağlığı sorunudur. Erişkin yaş grubunun yanında, çocukluk çağına da analjezik, antipiretik ve anti-inflamatuar olarak kullanımı nadir olmayan, özellikle romatolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan NSAİ'lerle ilgili Gİ mukozaya hasarları görülmektedir.<sup>1,23</sup> Kullanım güvenilirliğini arttırmak için, bir yandan daha güvenli anti-inflamatuarların (yüksek selektiviteli COX-2 inhibitörleri, nitrik oksit (NO) içeren NSAİ preparatları gibi) geliştirilmesine çalışılırken, NSAİ kullanımı sırasında ve öncesinde Gİ mukozada koruyucu ve tedavi edici özellik taşıyan ajanların kullanımı ile ilgili araştırmalar da ön plana çıkmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, Gİ komplikasyon riskinin azaltılmasında, NSAİ ilaçlarla birlikte, H<sub>2</sub> reseptör antagonistleri, PPI, misoprostol gibi ajanların kullanılması önerilmektedir.<sup>19,24</sup>

NSAİ kullanımı öncesinde mide mukozasının korunmasında, hasarın patogenezinde rol alan mekanizmaları hedefleyen ajanların kullanılması ile ilgili hayvan çalışmaları son yıllarda gündeme gelmiştir. Etanol ile indüklenmiş akut gastrik lezyonların önlenmesinde intragastrik ve IV yolla L-arjininin etkisi araştırılmış, intragastrik uygulamanın mide lezyonlarını azalttığı, bu koruyuculuğun mide kan akımındaki belirgin artış ile ilgili olduğu sonucuna varılmasına karşın, IV verilen L-arjinin ile etanole

etanole bağlı zararlanmada azalma saptanmamıştır. L-arjininden sentezlenen NO'nun mukozal bütünlüğün sağlanmasında duyusal nöropeptidler ve PG'lerle etkileşerek mukozayı koruduğu düşünülmüştür.<sup>25</sup>

Tavşanlarda, iskemi-reperfüzyon sonrası midede hasarlanma oluşturulan bir diğer çalışmada, L-arjinin (İV infüzyon) uygulamasının ardından makroskobik ve mikroskobik olarak mukoza nekrozunun anlamlı ölçüde azaldığı belirlenmiştir.<sup>26</sup> Ohta ve ark.nın çalışmasında ise, stresle indüklenen sıçan mide mukozası lezyonlarında, intraperitoneal olarak uygulanan (600 mg/kg) arjininin mide mukus sentezini optimal düzeyde tutarak ve NO oluşumuna katkıda bulunarak mukoza hasarını azalttığı gösterilmiştir.<sup>27</sup> Oral L-arjininin ibuprofen ile zararlandırılan mide mukozasındaki koruyucu etkisinin, erken dönemde, siklooksijenaz/PG yolunu, sonraki fazda NO yanıtını etkileyerek oluştuğu belirtilmektedir.<sup>5</sup>

Bir başka çalışmada ise, HCl asit solüsyonu ile mideleri irrigate edilen sıçanlarda, işlem öncesinde, L-glutamin, L-glisin ve L-sistein karışımının intraperitoneal uygulanması ve içme suyuna glukoz veya askorbat eklenmesinin asit perfüzyonunun mide mukozasındaki etkisini inhibe ettiği histolojik olarak gösterilmiştir.<sup>11</sup> 2003'te Arafa ve ark.nın gerçekleştirdiği çalışmada ise, alkol ile indüklenerek midede oluşturulan lezyonların önlenmesinde, karnitin esterlerinin koruyucu etkisi olduğu, bu gastroprotektif etkinin antioksidan mekanizmalarla gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.<sup>28</sup> Alkolle indüklenerek sıçanda mide hasarlanması oluşturulan bir diğer çalışmada, intraperitoneal pentoksifilinin NO üzerinden gerçekleşen koruyucu etkisi olduğu saptanmıştır.<sup>29</sup>

Soğuk stresi ile mide mukozası hasarlandırılan ve 4 gruba ayrılan sıçanlardan 1 ve 3. gruba intragastrik olarak 10 gün boyunca serum fizyolojik, 2 ve 4. gruba 50 mg/kg/g L-karnitin verilerek ülser indeksi, mide asit salgısı, gastrik mukozadaki musin ve PGE<sub>2</sub> düzeyleri araştırılmış; karnitin alan sıçanlarda mukozal hasarlanmanın daha hafif olduğu gösterilmiştir.<sup>7</sup> Etanole oluşturulan mide lezyonlarında koruyucu etki sağlamak amacı ile intravenöz omeprazol verilen sıçanlarda; ülser

indeksinin ve doku nekrozu derecesinin kontrol grubuna göre düşük olduğu, omeprazolun mukoza kan akımı ile NO oranını arttırarak bu etkisini gerçekleştirdiği bulunmuştur. Aynı çalışmada, L-arjinin uygulanan sıçanlarda, omeprazol aksine, mukozada koruyucu etki görülmemiştir.<sup>27</sup> NSAİ tedavisi alan erişkin hastalarda ranitidinin (150 mg/kg/g) etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ranitidinin mukoza hasarını iyileştirici özelliği üzerinde durulmuştur.<sup>13</sup> Plasebo kontrollü başka çalışmalarda da, NSAİ kullanan artritli hastalarda ranitidinin koruyucu etkisi gösterilmiştir.<sup>1,30</sup>

Deneysel çalışmamızda, L-arjinin ile profilaksi yapılan grupta, naproksen sodyum ve HCl asit uygulamasının ardından gastrik mukoza incelendiğinde, arjininin mukoza hasarlanmasını azaltıcı etki göstermediği belirlenmiştir. Makroskobik lezyonlar bakımından kıyaslandığında arjinin alan grup ile profilaksi yapılmayan kontrol grubu arasında farklılık yoktur, her 2 grupta da tüm sıçanlarda makroskobik mukoza hasarı gözlenmiştir. Histolojik olarak karşılaştırma yapıldığında, arjinin grubunda sıçanların %15'inde lezyon saptanmazken, kontrol grubunda bu oran %3, ranitidin grubunda ise %21'dir. Histomorfometrik açıdan ranitidin ve L-arjininin karşılaştırılmasında ise, ranitidin uygulanan grupta mukoza kalınlığının daha fazla olduğu ve morfometrik olarak arjinin ile ranitidin grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır (p< 0.05).

L- karnitin ve glutamin uygulanan sıçan gruplarında, makroskobik lezyonlar ve histomorfometrik analiz yönünden anlamlı farklılık görülmemiştir. Her 2 grubun histolojik değerlendirmesinde, mide mukozasında lezyonu olmayan sıçan sayısının eşit olduğu (%18), en ağır lezyon tipi olan tip 3 lezyonun görülmediği, karnitin ve glutaminin gastroprotektif etkilerinin benzer olduğu belirlenmiştir. Diğer ajanlarla karşılaştırıldıklarında, hasarlanmadan koruyucu özellikleri arjinine göre yüksek iken, ranitidine göre daha azdır. Ancak istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, bu ajanlar arasında oluşturdukları hasarlanma açısından farklılık bulunmamaktadır (p> 0.05).

Çalışmamızda NSAİ + HCl asit uygulaması öncesi profilaktik olarak ranitidin verilen sıçanlar-

da, makroskobik olarak ülser oranının daha az olduğu görülmüş ve histolojik olarak tüm mukoza tabakalarının etkilendiği tip 3 lezyon saptanmamıştır. Ranitidin ile profilaksi yapılan grupta mukoza hasarı olmayan (lezyonsuz) sıçan sayısı, diğer gruplardan farklılık göstermiş, ranitidin grubunda mikroskobik düzeyde lezyonu olmayan sıçan sayısı %77.77 iken, arjinin grubunda %50, kontrol grubunda %10 bulunmuştur. Kontrol grubu ile ranitidin grubu histolojik olarak lezyonun olmaması bakımından karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir ( $p=0.035$ ).

Oluşan mukoza hasarlanmaları midedeki lokalizasyonlarına göre değerlendirildiğinde; lezyonların, literatürün aksine korpusta daha yüksek oranda olduğu gözlemlendi.<sup>21</sup> Buna karşın, korpusta saptanan mukoza hasarlarının histolojik olarak daha az şiddetli (tip 1 ve 2) tiplerde olması, antrumda ise, tip 3 lezyonun fazla görülmesi de dikkat çekici idi.

Literatürde, çalışmamızda kullanılan ilaçların Gİ sistemdeki hasarlanmayı önleyici ve giderici nitelikleri ile ilgili araştırmalar olmasına karşın, bu ajanların birbiri ile karşılaştırıldığı yayınlar az sayıdadır. NSAİ kullanımı sonucu gastrik hasarın önlenmesinde farklı ajanların karşılaştırıldığı çalışmamızda, ranitidin dışındaki ajanların birbirlerine karşı üstünlüğünün olmadığını gösteren sonuçların olmasına karşın, sıçanlara uygulanan tüm ajanlarla ilgili daha geniş ve biyokimyasal mediatörleri de kapsayan araştırmalara gereksinim vardır. Ancak özellikle, romatolojik hastalıkların daha sık görüldüğü, geç çocukluk ve adolesan dönemlerdeki hasta grubunda, ranitidin, glutamin ve karnitin kullanımı ileri araştırmalar eşliğinde sorgulanmalıdır.

#### KAYNAKLAR

1. Wolfe MM, Lichtenstein DR, Singh G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 1999;340:1888-99.
2. Wallace JL, McKnight W, Miyasaka M, et al. Role of endothelial adhesion molecules in NSAID- induced gastric mucosal injury. *Am J Physiol* 1993;265:G993-8.
3. Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N. NSAID-induced gastric damage in the rats: Requirement for inhibition of both cyclooxygenase-1 and 2. *Gastroenterology* 2000;119:706-14.
4. Wallace JL, Keenan CM, Granger DN. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil –dependent process. *Am J Physiol* 1990;259(3 Pt 1): G462-7.
5. Jimenez D, Martin MJ, Pozo D, et al. Mechanisms involved in protection afforded by L-arginine in ibuprofen-induced gastric damage: Role of nitric oxide and prostaglandins. *Dig Dis Sci* 2002;47:44-53.
6. Kalia N, Bardhan KD, Reed MW, Jacob S, Brown NJ. L-arginine protects and exacerbates ethanol-induced rat gastric mucosal injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:915-24.
7. Izgut-Uysal VN, Agac A, Derin N. Effect of carnitine on stress-induced lipid peroxidation in rat gastric mucosa. *J Gastroenterol* 2001;36:231-6.
8. Ohta Y, Nishida K. Protective effect of L-arginine against stress-induced gastric mucosal lesions in rats and its relation to nitric oxide-mediated inhibition of neutrophil infiltration. *Pharmacol Res* 2001;43:535-41.
9. Nishida K, Ohta Y, Ishiguro I. Modulation of stress-induced gastric mucosal lesions by exogenous L-arginine. *J Lab Clin Med* 1999;133:440-50.
10. Akisu M, Ozmen D, Baka M, et al. Protective effect of dietary supplementation with L-arginine and L-carnitine on hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice. *Biol Neonate* 2002;81:260-5.
11. Tariq M, Parmar NS, Ageel AM. Gastric and duodenal antiulcer and cytoprotective effects of proglumide in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;241:602-7.
12. Okabe S, Takeuchi K, Urushidani T, Naganuma T, Takagi K. Effects of L-glutamine on acetylsalicylic acid-induced gastric lesions in normal and cirrhotic rats. *Jpn J Pharmacol* 1975;25:687-91.
13. Lancaster-Smith MJ, Jaderberg ME, Jackson DA. Ranitidine in the treatment of non-steroidal anti-inflammatory drug associated gastric and duodenal ulcers. *Gut* 1991;32:252-5.
14. Holzer P, Jovic M, Cabre F, Mauleon D. Estimation of acute flurbiprofen and ketoprofen toxicity in rat gastric mucosa at therapy-relevant doses. *Inflamm Res* 2001;50:602-8.
15. Natale G, Lazzeri G, Blandizzi C, et al. Seriate histomorphometry of whole rat stomach: An accurate and reliable method for quantitative analysis of mucosal damage. *Toxicology and Appl Pharmacol* 2001;174:17-26.
16. Kaufman DW, Shapiro S. Epidemiological assessment of drug-induced disease. *Lancet* 2000;356:1339-43.
17. Singh G, Ramey DR, Morfeld D, Shi H, Hatoum HT, Fries JF. Gastrointestinal tract complications of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment in rheumatoid arthritis: A prospective observational cohort study. *Arch Intern Med* 1996;156:1530-6.
18. Hernandez-Diaz S, Rodriguez LA. Association between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper gastrointestinal tract bleeding/perforation: An overview of epidemiologic studies published in the 1990s. *Arch Intern Med* 2000;160:2093-9.
19. Allison MC, Howatson AG, Torrance CJ, Lee FD, Russell



- RI. Gastrointestinal damage associated with the use of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 1992;327:749-54.
20. Hawkey CJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastroenterology* 2000;119:521-35.
21. Singh G, Triadafilopoulos G. Epidemiology of NSAID-induced GI complications. *J Rheumatol Suppl* 1999;56:18-24.
22. Huang XR, Chun Hui CW, Chen YX, et al. Macrophage migration inhibitory factor is an important mediator in the pathogenesis of gastric inflammation in rats. *Gastroenterology* 2001;121:619-30.
23. Berni Canani M, Cirillo B, Della Rotonda GM, Berni Canani R. Gastric mucosa changes caused by anti-inflammatory agents in childhood. *Pediatr Med Chir* 1996;18:377-81.
24. Hawkey CJ. The gastroenterologist's caseload: Contribution of the rheumatologist. *Semin Arthritis Rheum* 1997;26(6 Suppl 1):11-5.
25. Brzozowski T, Konturek SJ, Sliwowski Z, Drozdowicz D, Zaczek M, Kedra D. Role of L-arginine, a substrate for nitric oxide-synthase, in gastroprotection and ulcer healing. *J Gastroenterol* 1997;32:442-52.
26. Ozturk H, Kara IH, Otcu S, Kilinc N, Yagmur Y. Influence of L-NAME and L-Arg on ischaemia-reperfusion induced gastric mucosa damage. *Acta Gastroenterol Belg* 2002;65:150-4.
27. Ohta Y, Nishida K. L-arginine protects against stress-induced gastric mucosal lesions by preserving gastric mucus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:32-8.
28. Arafa HM, Sayed-Ahmed MM. Protective role of carnitine esters against alcohol-induced gastric lesions in rats. *Pharmacol Res* 2003;48:285-90.
29. Yonecti N, Kosekli MA, Ozutemiz AO, et al. Effects of pentoxifylline on alcohol-induced gastric injury and acid secretion in rats. *Dig Dis Sci* 2003;48:1392-6.
30. Robinson MG, Griffin JW Jr, Bowers J, et al. Effect of ranitidine on gastrointestinal mucosal damage induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Dig Dis Sci* 1989;34:424-8.