



KRONİK NİTRİK OKSİT SENTAZ İNHİBİSYONUNUN SIÇAN MİDESİNDE MEYDANA GETİRDİĞİ HİSTOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

HISTOLOGICAL CHANGES IN THE RAT STOMACH AFTER CHRONIC NITRIC OXIDE SYNTHASE INHIBITION

FeralÖZTÜRK¹ Ersin FADILLIOĞLU² Murat YAĞMURCA¹ Meltem KURUŞ¹ Nigar VARDI¹
M. Hanifi EMRE²

¹Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Malatya

²Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Malatya

Anahtar Sözcükler: nitrik oksit sentaz, L-NAME, mide, ışık mikroskopi
Key Words: nitric oxide synthase, L-NAME, stomach, light microscopy.

ÖZET

Bu çalışmada Wistar cinsi albino dişi sıçanlara iki hafta süreyle H²-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) verilerek kronik nitrik oksit sentaz (NOS) inhibisyonu oluşturuldu ve midelerinde meydana gelen histolojik değişiklikler incelendi. 15 adet sıçan üç gruba ayrıldı. I. grup kontrol, II. ve III. gruplar deney gruplarını oluşturdu. L-NAME sıçanların içme suyuna karıştırılarak uygulandı; II. ve III. gruplara sırasıyla 100mg/L ve 500mg/L dozda verildi. İki haftanın sonunda, kontrol grubu ve deney gruplarından alınan mide korpus kesitleri ışık mikroskobunda incelendi. I. ve II. gruplarda mide kesitlerinde bütün tabakalar normal histolojik görünümde izlenirken, III. grubu oluşturan sıçanların mide mukozalarında yer yer bez lümenlerinde dilatasyon ve çevreleyen bez hücrelerinde atrofi; bezlerin bazal bölgelerinde pariyetal hücre yoğunlaşması izlendi. Korpus bezlerinin tamamında boyun mukus hücre salgılarının, I ve II. gruplarda periyodik-asit Schiff (PAS) pozitif, III. grupta PAS negatif reaksiyon verdikleri gözlemlendi. Sonuç olarak kronik NOS inhibisyonunun, sıçan mide mukozasında ışık mikroskopik değişikliklere neden olduğu saptandı.

SUMMARY

We examined the histological changes in the rat stomachs, following chronic nitric oxide synthase (NOS) inhibition with the administration of H²-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), for two weeks. Fifteen adult female Wistar albino rats were divided into three groups. Group I was the control group. Group II and III received 100mg/L and 500mg/L L-NAME respectively, with their drinking waters. With light microscopy, the stomach histology were found normal in groups I and II. In group III, parietal cells found more numerous in the bases of the gastric glands and some of the gastric glands showed local dilatations. Gland cells were atrophic around the dilated lumens. In corpus glands, the secretions of all the neck mucous cells, were periodic acid-Schiff (PAS) negative in group III, while they were PAS positive in groups I and II. In conclusion, it has been observed that chronic NOS inhibition alters rat stomach microscopy.

Yazışma adresi: Feral Öztürk, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Malatya
Makalenin geliş tarihi: 20. 06. 2001; kabul tarihi: 02. 11. 2001

GİRİŞ

NİTRİK oksitin (NO) memelilerin endotel hücrelerinde sentezlendiği, ilk kez 1987 yılında saptanmıştır. Bu tarihten itibaren yapılan pek çok çalışma NO'nin dolaşım sistemi, sinir sistemi ve immun sistem başta olmak üzere bütün sistemlerde önemli bir biyolojik mediatör olduğunu

göstermiştir (13,19). NO; hücre içinde L- arginin'in nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından yıkılması sonucu L-sitrülin ile birlikte açığa çıkar (3). NO hedef hücrede çözünebilir guanilat siklazı (sGC) aktive ederek siklik guanozin monofosfat (cGMP) konsantrasyonunu artırır. cGMP düz kaslarda gevşeme yapar. NO, damar duvarlarındaki düz kaslarda oluşturduğu gevşeme ile kan basıncının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (4).

NO'in sindirim sisteminde bulunan düz kaslarda gevşeme yaptığı gösterilmiştir. Bu etki, NO'in sindirim sistemi düz kaslarına gelen otonom nitreerjik sinirlerden nörotransmitter olarak salgılanması ile oluşur (2,4). Aynı zamanda bu bölgedeki kan damarlarında vazodilatasyon oluşturarak kan akımını düzenlemektedir (1,5). Midede mukoza bütünlüğünün korunmasında NO'in önemli bir mediatör olduğu gösterilmiştir. Bu etkiyi mukozal kan akımını düzenleyerek, mukus, asit ve alkali sekresyonu kontrol ederek sağlamaktadır (6-8).

NOS enzimleri L-arginin analogları tarafından baskılanabilmekte ve NO oluşumu deneysel olarak engellenebilmektedir. Bu amaçla kullanılan L-arginin analoglarından bir tanesi N^ω-amino-L-arginine methyl ester (L-NAME)'dir (10). L-NAME suda erir, oral olarak alındığında aktiftir. L-NAME sıçanların içme suyuna karıştırılarak verildiğinde, sıçanların su içmesini etkilemediği gösterilmiştir (1). Bu metotla oluşturulan NOS inhibisyonu ile sıçanlarda sistemik kan basıncının bir hafta içinde arttığı gösterilmiştir (21). Kan basıncının artması NO inhibisyonunun gerçekleştiğini göstermektedir (12).

Bu çalışmanın amacı, NO yapımının deneysel olarak engellenmesi durumunda sıçan midesinde oluşması muhtemel değişikliklerin ışık mikroskopik seviyede araştırılmasıdır.

Hayvanlar ve deneysel düzenek

Çalışmada, ağırlıkları 200-240g arasında değişen 15 adet erişkin, Wistar Albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Denekler üç gruba ayrıldı: I. gruba (kontrol, n=5) içme suyu olarak çeşme suyu verildi. II.(n=5) ve III. (n=5) grupların içme sularına sırasıyla 100 mg/L ve 500 mg/L L-NAME ilave edilerek iki hafta süreyle verildi (11).

Kan Basıncı Ölçümleri

iki haftanın sonunda intraperitoneal üretranla (1.2-1.4g/kg) uyutulan sıçanların karotid arterleri kanule edilerek, bir transducer (Harvard 50-8952) ve kaydedici (Harvard Universal Pencoder) aracılığı ile kan basınçları ölçüldü.

Histolojik Araştırma Yöntemleri

Sıçanların midelerinin korpus bölgeleri alınarak Bouin solüsyonu ve % 10'luk nötral tamponlanmış formalinde tespit edildi. Rutin doku takibi sonrasında parafine gömülen dokulardan 6µ'luk kesitler alınarak hematoksilin-eozin, Massön trikrom, peryodik-asit Schiff (PAS), alcian

blue-kernechtrot metodları ile boyandılar (1,12). Boyanan kesitler Olympus BH2 araştırma mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

İstatistiksel Araştırma Yöntemleri

Üç grubun kan basınçları aritmetik ortalama ± ortalama standart hata olarak hesaplandı. İstatistiksel inceleme Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. p<0.05 olan değerler anlamlı kabul edildi. Farklılığı yaratan grubu saptamak için, gruplar ikili olarak Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. p<0.01 olan değerler anlamlı kabul edildi (13).

BULGULAR

Kan Basıncı Bulguları

II. ve III. gruplara ait sıçanların kan basınçlarının I. gruba (kontrol) göre arttığı tespit edildi (p<0.05). II. ve III. gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi (p>0.01) (Tablo 1). Kan basınçlarındaki artış NOS inhibisyonunun gerçekleştiğini göstermektedir (14).

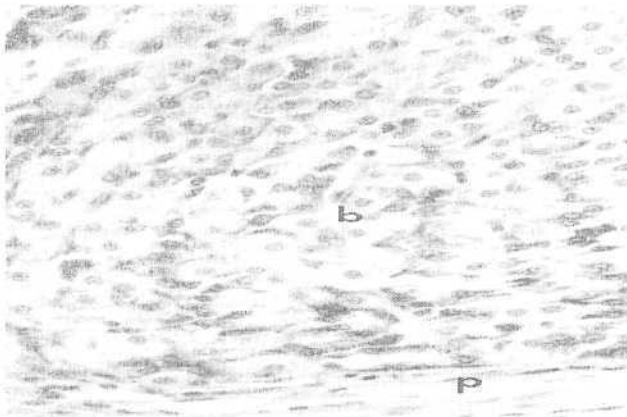
Tablo. I. Grup (kontrol), II. grup (100mg/L L-NAME) ve III. grup (500mg/L) sıçanların kan basınçları (mmHg) (Ölçümler karotid arterinden yapılmıştır).

	Diastolik*	Sistolik*
I.Grup (n=5)	56.00±2.45 ^a	94.00±2.45 ^a
II.Grup (n=5)	91.00±3.67	132.00±3.39
III.Grup(n=5)	89.00±7.67	138.00±5.83

*p<0.05, Kruskal-Wallis. ^ap<0.01, Mann-Whitney-U.

Işık Mikroskopik Bulgular

I.Gruba (kontrol) ait olan mide kesitlerinde hematoksilin-eozin ve diğer boyama metodları ile sıçan midelerinin tunika mukoza (Resim 1), tunika submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza tabakaları normal histolojik görünümde izlendi. PAS boyaması ile yüzey mukus hücrelerinde, isthmus ve boyun mukus hücrelerinde salgı materyali PAS pozitif boyandı (Resim 2). Alcian blue- kemechtrot metodu ile sadece isthmus mukus hücrelerinin salgı materyali mavi renkte boyanmış olarak izlendi (Resim 3).



Resim 1. Kontrol grubu sıçan midesi. Normal histolojik görünümde mide bezleri(b) ve lamina propria (p). Hematoksilin-eozin, X 132.

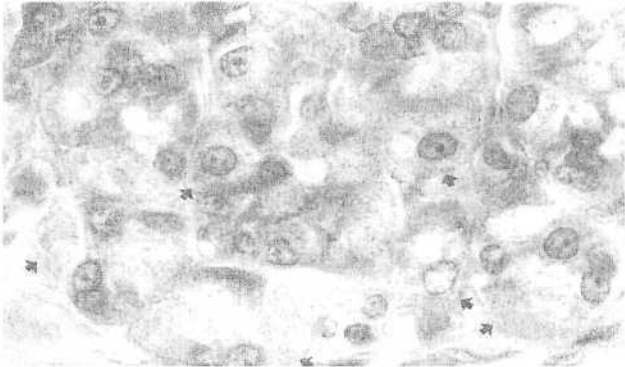


Resim 2. Kontrol grubu sıçan midesi. Yüzey mukus hücrelerinde (kalın ok) ve boyun mukus hücrelerinde (ince ok) PAS pozitif salgı materyali. PAS, X66.

II. gruba ait olan (L-NAME, 100mg/L) kesitlerde de tunika mukoza, tunika submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza tabakaları normal histolojik görünümde izlendi. Yüzey mukus hücrelerinde, isthmus ve boyun mukus hücrelerinde salgı materyali PAS pozitif izlendi. Alcian blue-kernechtrot metodu ile sadece isthmus mukus hücrelerinin salgı materyali mavi renkte boyanmış olarak izlendi.

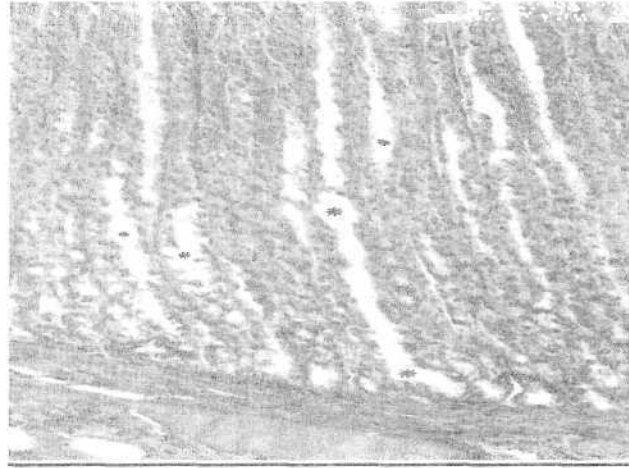


Resim 3. Kontrol grubu sıçan midesi, isthmus mukus hücrelerinde mukus salgısı(ok). Alcian blue-kernechtrot, X132.



Resim 4. L-NAME (500mg/L) uygulanan sıçan midesi. Mide bezlerinin bazal kısımlarında sık olarak izlenen pariyetal hücreler (ok) ve lamina propria (p). Masson trikrom boyama metodu, X330.

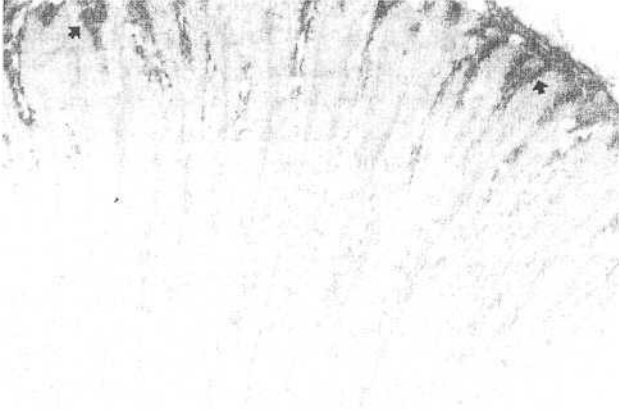
III. grup sıçanların (L-NAME, 500mg/L) mide kesitlerinde, tunika mukoza tabakasında histolojik değişiklikler tespit edildi. Hematoksilen eozin ve Masson trikrom boyalan ile pariyetal hücreler III.grupta, bezlerin bazalinde yoğun olarak gözlemlendi. Bezlerin boyun ve isthmus bölgelerinde ise dağılımlarında bir değişiklik gözlenmedi (Resim 4). Aynı grupta korpus bölgesindeki bazı bezlerin lümenlerinde dilatasyonlar ve bu bölgelerde bez hücrelerinde atrofi izlendi (Resim 5,6). Yüzey mukus hücrelerinin salgı maddesi PAS pozitif boyanırken, boyun mukus hücreleri PAS negatif boyandı (Resim 7). Alcian blue-kernechtrot boyası ile isthmus mukus hücrelerinin salgıları mavi renkte izlendi (Resim 8). Lamina muskularis mukoza, tunika subseroza, tunika muskularis ve tunika seroza tabakaları normal histolojik görünümdeydi (Resim 9).



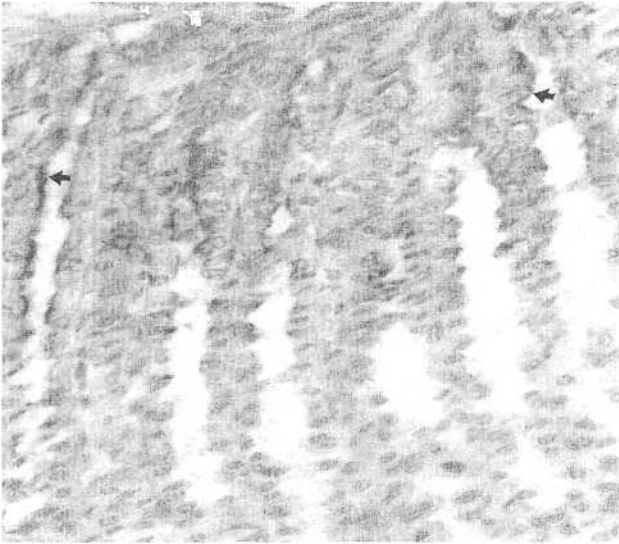
Resim 5. L-NAME (500mg/L) uygulanan sıçan midesi. Mide bezlerinin lümenlerinde dilatasyon (#). Masson trikrom, X66.



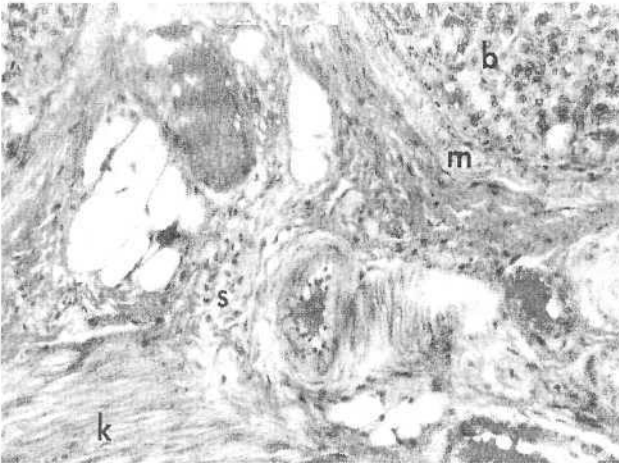
Resim 6. L-NAME (500mg/L) uygulanan sıçan midesi. Mide bezi hücrelerinde atrofi (ok), lamina propria (p). Alcian blue-kernechtrot, X132.



Resim 7 L-NAME. (500mg/L) uygulanan sıçan midesi. Yüzey mukus hücrelerinde (ok) PAS pozitif salgı materyali. PAS, X66.



Resim 8. L-NAME (500 mg/L) uygulanan sıçan midesi, isthmus mukus hücrelerinde mukus salgısı (ok). Alcian blue-kernechtrot, X132.



Resim 9. L-NAME (500 mg/L) uygulanan sıçan midesi. Mide bezleri (b), lamina muscularis mukoza (m), tunika submukoza (s), tunika muscularis (k).

TARTIŞMA

Mide mukozası üzerinde nitrik oksitin koruyucu etkisi çeşitli hayvan modelleri üzerinde gösterilmiştir. Bu deneylerde etanol asit alkali, hiperosmolar solüsyonlar, safra asiti, aspirin ve diğer nonsteroidal anti inflamatuvar ilaçlar (14-18) ve stres mukozal hasar oluşturmada kullanılmış ve NO'in bu hasarların iyileşmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (5). L-NAME ile NO sentezi inhibe edildiğinde ise mukozal hasardaki iyileşmenin geciktiği bildirilmiştir (18). Bu çalışma ise, NO'in sıçan midesindeki koruyucu etkisinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Gastrik mukoza hasarında artan NO sentezi ile mukus sekresyonu artışı arasında pozitif bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (7,15). L-NAME ile yapılan inhibisyonla bu artış engellenmektedir. Garcia-Vittoria ve ark. (19) immunohistokimyasal olarak, normal sıçan midesinde mukus salgılayan hücrelerde nöronal NOS aktivitesini pozitif bulmuşlardır. Mukus hücrelerinin aktivitesinde NO'in önemli rol oynadığını savunmaktadırlar. Çalışmamızda III. grupta yüzey mukus hücrelerinin sekretuar granülleri PAS pozitif boyandığı halde boyun mukus hücrelerinin, kontrol grubunun aksine PAS negatif boyandığı tespit edildi. Midede nötral müsünler PAS pozitif reaksiyon verirler (20). III. grupta boyun mukus hücrelerinin PAS negatif boyanmış olmaları, bu hücrelerin salgı üretme aktiviteierinde azalmaya bağlı olabileceği gibi salgı ph'nın değişmesine de bağlı olabilir. Alcian blue ile mide bezlerinde asit müsün salgı mavi renkte boyanır (20). Alcian-blue ile isthmus mukus hücrelerinin salgı materyalleri her üç grupta da mavi olarak boyandı. Yüzey ve boyun mukus hücreleri boyanmadı. Kontrol grupları ile deney grupları arasında belirgin bir farklılık görülmedi.

NO'in midede, endojen vazodilatatör etki göstererek mukozadaki kan akımını düzenlediği ve mukozal bütünlüğün korunmasında önemli olduğu bildirilmiştir (14). Çalışmamızda NO inhibisyonu uygulanan deney gruplarında, sıçan midesindeki kan damarlarında ışık mikroskopik olarak herhangi bir değişiklik tespit etmedik. Ancak bazı mide bezlerinde lümende dilatasyon ve bu bölgelerde bez hücrelerinde atrofi izlendi. Bez hücrelerinde ortaya çıkan bu atrofi, bezleri besleyen kan damarlarının vazokonstriksiyonu sonucunda bezlerin iyi beslenememesine bağlı olarak ortaya çıkmış olabilir.

Çalışmamızda tunika submukoza, tunika muskularis ve tunica seroza tabakaları her üç grupta da normal ışık mikroskopik görünümde izlendi, iki haftadan daha uzun süre NOS inhibisyonu yapıldığı takdirde, bu tabakalarda da patolojik bulguların oluşabileceği düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak bu çalışmada, kronik NOS inhibisyonu uygulanan (500mg/L) sıçan midelerinin tunika mukoza tabakasında bir kısım bezlerde atrofik değişiklikler,

atrofiye uğramayan bezlerin bazal bölgelerinde parietal hücre yoğunlaşması, boyun mukus hücre salgı madde-sinin PAS yöntemi ile boyanma özelliklerinde değişiklikler gibi bulgular bulunmuştur. Yapılan çeşitli çalışmalarla, NO'nin mide mukoza hasarının iyileşmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (5,14-18). Çalışmamız, NO'nin

midede sadece mukozal hasarın iyileştirilmesinde değil, aynı zamanda normal mukozal yapının korunmasında da önemli olduğu yönünde bulgular vermektedir. NO'nin mide bezlerindeki koruyucu rolünün tam olarak açıklanabilmesi için, ileri araştırmaların uygun olacağı düşüncesindeyiz,

KAYNAKLAR

1. Smith A, Bruton J. A Colour Atlas of Histological Staining Techniques London, Wolfe Medical Publications, 1977, 143,152-153.
2. Vallance P, Collier J. Fortnightly review biology and clinical relevance of nitric oxide. BMJ 1994;309: 453-457.
3. Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. Lancet 1993;341: 465-466.
4. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. Epstein FH (ed). Mechanisms of Disease. N Engl J Med 1993;329(27): 2002-2012.
5. Takeuchi K, Suzuki K, Yamamoto H et al. Cyclooxygenase-2 selective and nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastric mucosal responses. J Physiol Pharmacol 1998;49(4): 501-513.
6. Brown JF, Keates ac, Hanson PJ, Whittle BJR. Nitric oxide generators and Cgmp stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. Am J Physiol 1993;265 (Gastrointest. Liver Physiol 28): g418-G422.
7. Marubuchi S, Mori Y, Noto M et al. Implication of endogenous nitric oxide in gastric mucosal protective effect of T-593, a novel anti-ulcer agent, in rats. Jpn J Pharmacol 1999;79: 195-202.
8. Wallace JL. Cooperative modulation of gastrointestinal mucosal defence by prostoglandins and nitric oxide. Clin Invest Med 1996;19(5):346-351.
9. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. Pharmacol Rev 1997;49(2): 137-142
10. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. J Clin Invest 1992; 90:278-281.
11. Yoneyama T, Ohkawa S, Watanabe T et al. The contribution of nitric oxide to renal vascular wall thickening in rats with L- NAME induced hypertension. Virchows Arch 1998;433:549-557.
12. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Laboratory Methods in Histotechnology Washington DC, American Registry of Pathology, 1992;53-55, 156.
13. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. Biyoistatistik 4. baskı. Ankara, Özdemir Yayıncılık, 1993, 145,152.
14. Qiu BS, Pfeiffer CJ, Cho CH. Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition in cold-restraint and ethanol -induced gastric mucosal damage in rats. Digestion 1996;57:60-66.
15. Ma L, Wallace JL. Endothelial nitric oxide synthase modulates gastric ulcer healing in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2000;279:341-346.
16. Takeuchi K, Yasuhiro T, Asada Y, Sugawa Y. Role of nitric oxide in pathogenesis of aspirin-induced gastric mucosal damage in rats. Digestion 1998;59:298-307.
17. Takeuchi K, Takehara K, Kaneko T, Okabe S. Nitric oxide and prostoglandins in regulation of acid secretory response in rat stomach following injury. J Pharmacol Exp Ther 1995;272:357-363.
18. Bulut R, Ünlüçerçi Y, Bekpınar S, Kuntsal L, Nitric oxide-mediated regulation of gastric H⁺, K⁺ - ATPase and alcohol dehydrogenase following ethanol-induced injury in rats. Digest Dis Sci 1999;44: 1471-1422.
19. Garcia-Vitoria M, Garcia-Corchon C, Rodriguez JA et al. Expression of neuronal nitric oxide synthase in several cell types of the rat gastric epithelium. J Histochem Cytochem 2000;48:1111-1119.
20. Eşrefoğlu M, Selimoğlu MA. Wistar albino farelerde sindirim kanalı münislerinin histokimyasal özellikleri. T Klin J Gastroenterohepatol 2000; 11:25-35.
21. Stark ME, Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. Gastroenterology 1992; 103:1928-1949.

*Bu çalışma 18-20 Mayıs 2000 Kayseri, XVIII. Gevher Nesibe Tıp Günleri, III. Deneysel ve Klinik Araştırma Kongresi ve "Workshop"unda poster bildiri (P42) olarak sunulmuştur.