

T.C  
İstanbul Üniversitesi  
İstanbul Tıp Fakültesi  
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

RADYASYON ENTERİTİNDE NİTRİK OKSİD  
YOLUNUN ENGELLENMESİNİN SONUÇLARI

( Deneysel Çalışma )

( UZMANLIK TEZİ )

Dr. CENGİZ DİBEKOĞLU

İSTANBUL - 1996

İstanbul Tıp Fakóltesi'ndeki uzmanlık eğitimin süresince bilgi ve becerilerinden yararlandığım saygıdeğer hocalarıma, tezimi hazırlamada çok büyük destek ve katkıları olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Selçuk Mercan'a, yine tezimin hazırlanmasında desteğini ve yardımlarını esirgemeyen sayın Op. Dr. Yeşim Erbil'e, birlikte çalışmaktan mutluluk ve zevk duyduğum hiç bir zaman unutamayacağım sevgili asistan arkadaşlarıma, bana her konuda destek olan anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkürü borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1
TARİHÇE	3
GENEL BİLGİLER	4
GEREÇ VE YÖNTEM	24
BULGULAR	28
TARTIŞMA	36
SONUÇ	40
KAYNAKLAR	41

# GİRİŞ

Radyasyon enteriti, genellikle serviks, mesane, rektum kanserleri ve diğer batin içi habis hastalıkların tedavisi için pelvise, batına veya her ikisine birden radyasyon uygulanması sonucu ortaya çıkan ve gastrointestinal fonksiyonları bozan klinik bir tablodur<sup>(49)</sup>. Hastalık genellikle akut seyirlidir ve tablo bir süre sonra kendiliğinden düzelebilir. Fakat radyasyon enteritinin klinik bulguları 6 aydan daha uzun sürerse durum kronik olarak değerlendirilir<sup>(7,35,49)</sup>. Terapötik amaçlı pelvik radyasyon uygulanmış hastaların % 50-75 inde radyasyon enteritinin akut bulguları ortaya çıkar.<sup>(2)</sup> Bazen radyasyon enteritinin ilk bulguları yıllar sonra da ortaya çıkabilir. Jacobs<sup>(18)</sup> ilk bulguların 32 yıllık bir aradan sonra dahi ortaya çıkabildiğini göstermiştir.

Kronik radyasyon enteritinin ise bir çok seride % 5-11 arasında değişen oranlarda ortaya çıktığı ve bunlarında yaklaşık % 20'sinin cerrahi girişim gerektirdiği belirtilmiştir<sup>(7,28)</sup>

Radyasyon enteritinin akut belirtileri sulu diare, kramp tarzında karın ağrıları, bulantı ve kusmadır<sup>(8,41,49)</sup>.

Kronik radyasyon enteritinin bulguları ise fibrozise bağlı obstrüksiyon, fistül, abse oluşumu, intestinal iskemi, nekroz, perforasyon ve malabsorbsiyon olarak karşımıza çıkabilir<sup>(7,13,28,41)</sup>.

Batin radyasyonuna bağlı gelişen radyasyon enteriti, hastanın ölümüne neden olabildiği gibi kendiliğinden de gerileyebilir.

Radyasyon enteritini önlemeye yönelik yapılan klinik ve deneysel çalışmalar günümüzde de halen devam etmektedir. Bu çalışmalarını yapan

araştırmacıların bazıları kimyasal ve farmakolojik ajanları <sup>(9,29,36)</sup> bazıları ise cerrahi yöntemleri <sup>(5,6,10,11,12)</sup> kullanmışlardır. Fakat radyasyon enteritinin oluşumunu engelleyecek bir yöntem řu ana kadar bulunamamıştır.

Çalışmamızda, inflamatuvar cevapta önemi son yıllarda ortaya çıkarılan nitrik oksid yolunda, nitrik oksid sentezini inhibe ederek radyasyon enteritinin hasarını önlemeyi veya azaltmayı amaçladık.

## **TARİHÇE**

Bir fizikçi olan Roentgen 1895 yılında “ Yeni bir ışın şekli” olarak X ışınlarını keşfetti. Bu yeni keşfin diagnostik potansiyeli Ocak 1896 tarihinde Roentgen’in demanstrasyon amacıyla bir arkadaşının elinin radyografisini alması ile anlaşıldı <sup>(8)</sup>. Bu keşiften 2 yıl sonra abdominopelvik radyoterapinin akut gastaintestinal istenmeyen etkileri yayınlandı<sup>(46)</sup> . I.Dünya Savaşı bitmeden öncede radyasyonun kronik etkileri olan rektal striktürler ve fistüller çoktan bildirilmişti.

Avrupa’da radioterapinin bu yıllarda kanserler için yaygın olarak kullanılıyor olmasına karşın, Amerika Birleşik Devletleri’nde bunun kanser tedavisi için rutin olarak kullanılması II. Dünya Savaşı sonrasına rastlar <sup>(8)</sup>.

Radyasyon enteritinin ilk patolojik incelemeleri 1922 yılında yapılmış ve ince barsakların radyasyona en duyarlı batın içi organlar olduğu saptanmıştır <sup>(37)</sup>. Daha sonra radyasyon enteritinin histolojisi kapsamlı olarak ilk kez Warren ve Friedman <sup>(47)</sup> tarafından 1941 yılında yayınlanmıştır.

Radyasyon önceki yıllarda daha basit araçlarla, daha düşük dozlarda verilirken, son yıllarda daha modern, bilgisayarlı araçlar ile hedef organ daha iyi saptanarak radyoterapi yapılabilmektedir.

## ***GENEL BİLGİLER***

### ***A-RADYASYON ENTERİTİ***

#### ***1) PATOFİZYOLOJİ***

Radyasyon enteritinin patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır <sup>(49)</sup>. Radyasyon enerjisi etkisini hücre içi sıvısında serbest radikaller oluşturarak yapar. Serbest radikaller DNA sarmallarında kırıklara neden olur ve DNA transkripsiyonunu ve replikasyonunu bozarak daha sonraki mitotik bölünmede hücrenin ölümüne sebep olurlar <sup>(35,37)</sup>. Normal dokular ve tümörler çoğalma sıklıklarının oranına göre bir radyasyon cevabı gösterirler. Normal dokular tümörlü dokulara oranla radyasyon hasarını daha iyi ve çabuk tamir edebilirler <sup>(35)</sup>.

Hücreseel seviyede, radyasyonun etkileri radyasyonun uygulandığı andaki hücreseel bölünmenin fazlarına bağılıdır. Radyasyon hasarının olabilmesi için radyasyon esnasında interfazda olan, yani bölünmeyen hücreler o esnada bölünenlere göre daha fazla doz gerektirir <sup>(37)</sup>.

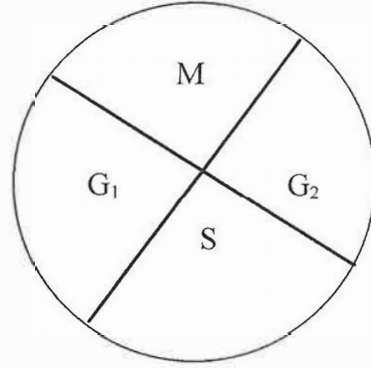
Hücre siklüsünün fazları şunlardır (***Şekil 1***)

**S:** DNA sentezi periodu

**G2:** Premitotik period; hücre bölünmesine hazırlık fazı

**M:** Mitoz

**G1:** Postmitotik period; RNA ve protein sentezinin gerçekleştiği faz



**Şekil 1 : Hücre siklusünün fazları**

G1 fazındaki hücreler radyasyona en duyarlı, S fazındakiler ise en dayanıklı olan hücreler olarak bilinmektedir.

Gastrointestinal sistemde radyasyona en duyarlı hücreler mukoza derinliklerinde olan ve hızlı çoğalan hücrelerdir ( stem cell ). Normal intestinal mukoza dinamikdir, mukozal yüzeydeki epitel hücreleri lümen içine soyularak atılırlar ve yerlerine intestinal kriptlerden orijinini alan ve olgunlaşarak mukozal yüzeye göç eden yeni hücreler gelir. Radyasyon tarafından harap edilen ve öldürülen hücreler işte bu hızlı bölünen hücrelerdir <sup>(37)</sup>.

Radyasyon aynı zamanda kan damarlarının endotel tabakasını, intestinal submukozanın bağ dokusu hücrelerini, vasküler adventisyayı ve intestinal sistemin destek yapılarını da etkiler <sup>(13,37)</sup>.

Küçük damarların endotel hücreleri büyük damarlarınkilere göre radyasyona daha fazla duyarlıdır. Damarlardaki bu patoloji daha yavaş gelişir ve bir süre sonra

lümenleri tıkanır. Bunun sonucunda bu damarların besledikleri dokularda atrofi gelişir.

Sonuçta radyasyonun geç komplikasyonları yani striktürler, fibrozis, ülser oluşması, nekroz ve perforasyonlar ortaya çıkar. Çoęu yazarlar radyasyonun bu geç komplikasyonlarını küçük vasküler yapılarıdaki bu geri dönüşü olmayan obliterasyonlarla açıklamaktadır <sup>(7,13,37,47,49)</sup>.

Belli bir organa karşı radyasyon hasarının derecesi aşağıda sıralanan koşullara bağlıdır.

- 1) Organın radyasyona duyarlılığı
- 2) Doz
- 3) Radyasyona maruz kalma süresi
- 4) Organı yenileyen hücrelerin radyasyona duyarlılığı
- 5) Organın rezerve fonksiyonel kapasitesi
- 6) Radyoterapi uygulanan organın radyasyon alan miktarı

Gastrointestinal sistemde radyasyona duyarlılık derecesi gittikçe azalan miktarda řu şekildedir: Duedenum, jejunum, ileum, özofagus, mide, kolon ve rektum <sup>(37)</sup>. Yani başka bir deyişle, duedenumda geç komplikasyonlar rektumdakilerden daha önce görülür.

Total radyasyon dozu, bunun zamanlanması ve parçalara bölünmesi, hedef organ çevresindeki organlara dağılımı ile radyasyon hasarının yakın ilişkisi vardır. Doz, parçalara bölünürse hem yan etkileri ve komplikasyonları daha az ortaya

çıkacaktır hem de daha fazla miktarda radyasyon dozu verilebilecektir. Örneğin; özofagusu bir kerede 3000 rad verilirse özofagus bunu tolere edemez fakat 4-6 hafta arasında 7000 rad verilirse bunu rahatlıkla tolere edebilir<sup>(37)</sup>.

Radyasyonun normal dokulara etkisini belirleyen bir diğer faktörde radyasyonun verildiği alan veya hacimdir. Eski radyoterapi tekniklerinde tümör tedavisi için gerekli alandan daha fazlasına radyasyon verilmekte iken, günümüzde yeni ve daha gelişmiş aletlerle tam hedef dokuya çevre sağlam dokulara en az zarar verilerek yapılabilmektedir.

Bu faktörlerin dışında radyasyon hasarını kolaylaştırıcı faktörlerde mevcuttur. Daha önce geçirilmiş batın ameliyatları bazı yazarlar tarafından hasarı kolaylaştırıcı faktör olarak gösterilmiştir. Bu yazarlara göre ince barsaklar geçirilmiş batın ameliyatlarından sonra oluşan adhezyonlardan dolayı hareket kabiliyetini yitirirler ve radyasyon alanında kalırlar<sup>(28)</sup>.

Diabetes mellitus, hipertansiyon ve inflamatuvar vaskülitte sekonder olan vasküler değişiklikler de predispozan faktör olarak gösterilmiştir. Burada radyasyonun var olan vasküler bozukluğu arttırıcı etkisinden söz edilmektedir<sup>(7)</sup>.

Zayıf bir fiziki yapıda predispozan faktördür. Bu tip hastalarda radyasyona karşı kalkan görevi yapan yağ dokusu şişmanlara göre daha azdır<sup>(13)</sup>.

Pelvik inflamatuvar hastalık da yine adhezyonlara yol açtığı için bir kolaylaştırıcı faktör olarak karşımıza çıkabilir.

Kemoterapi ile birlikte radyoterapininde yapılması risk faktörü olarak gösterilmiştir. Özellikle Adriomisin radyasyonun ince barsaklara yaptığı hasarı kolaylaştırdığı bilinmektedir.

## 2) *HİSTOPATOLOJİ*

Akut klinik period da ince barsakların radyasyona cevabı gastrointestinal sistemin diğer bölümlerinden farklı değildir. Geçici mukozal atrofi, submukozal ödem, hiperemi ve lamina proprianın, plazma hücreleri ve polimor nüveli löksitlerle infiltrasyonu ile seyreden progresif inflamasyon ve derin epitel hücrelerinde mitozun inhibisyonu görülmektedir <sup>(49)</sup>.

Trier ve Browning <sup>(44)</sup> mukozadaki değişiklikleri ilk bildiren araştırmacılarıdır. Onlara göre; mitoz sayısı birinci haftadan itibaren düşer ve tedavi boyunca da en düşük seviyede kalır. Dozun artması ile birlikte intestinal villusların kaybı kript hücrelerinin yenileme kapasitesini aşar. Bunun sonucunda villuslar kısalır ve total epitel yüzeyi azalır. Tedavi ilerledikçe lamina propriaya daha fazla hücre akını olur. En çok plazma hücreleri görülür, lenfositler ise daha azdır. Tedavinin 3. ve 4. haftasında kriptlerde mikroabseler gelişir ve en çok polimorf nüveli lökositler göze çarpar. Bu çarpıcı değişmelere rağmen hastaların şikayetleri ya çok azdır ya da hiç yoktur. Bu değişiklikler sadece ince barsakların ışına maruz kalmış bölgeleriyle sınırlıdır. Tedavinin bitiminden 3 gün sonra mitoz, 2 hafta sonra ise intestinal villuslar normale döner.

Hasleton ve ark. <sup>(15)</sup> radyasyon enteritinde özellikle vasküler değişiklikler üzerinde çalışmışlardır. Bu araştırmacılar damar mediasının kalınlaştığını ortaya çıkararak radyasyon enteritinde asıl hasarın damarlarda geliştiğini ve ilk hedefin de endotel hücreleri olduğunu vurgulamışlardır.

Akut fazın sonlarına doğru sınırlı bir reepitelizasyon olur fakat bu da önceki hasarın derecesine bağlıdır <sup>(37)</sup>.

Kronik periodda progresif bir vasküler skleroz ve mukozal atrofi mevcuttur. Histolojik olarak barsak duvarındaki küçük damarların obliteratif endarteriti, submukozal fibrozis ve lenfatik genişleme görülür<sup>(49)</sup>. Submukozal yapıların nedbe dokusu ile değişmesi sonucu vaskülarite daha da azalır ve barsak duvarı kalınlaşarak kontraktürler oluşur. Bunun sonucunda barsak tıkanıklıkları sıkça görülür fakat yıllar içinde yavaş yavaş kendisini belli eder. Kanama ve fistül oluşumu iyileşmeyen yüzeysel ülserlerin geç komplikasyonları olarak karşımıza çıkabilirler.

### **3) SEMPTOMLAR, BULGULAR, TEŞHİS VE TEDAVİ**

İnce barsak hasarının akut fazında en sık görülen sorun tedavi boyunca devam eden veya tedavi bittikten sonra da kısa bir süre görülen akut radyasyon enteritidir. Tüm karın bölgesi ışınlanan ve 150 rad/gün'den daha fazla doz alan hastaların hemen hemen tamamında buna rastlanır. Semptomlar genellikle kramp tarzında karın ağrısı, bulantı, iştahsızlık ve sulu dışkılamadır. Eğer bu şikayetler oluşuktan sonra radyasyona devam edilirse, bazı hastalarda sıvı-elektrolit dengesizlikleri görülebilir.

Fizik muayenede hafif hassas bir batın tespit edilebilir fakat distansiyon ve periton irritasyonu bulgularına pek rastlanmaz.

Tek veya çift kontrast ince barsak pasaj grafileri kontrast maddenin hızlı bir geçiş yaptığını gösterirler<sup>(37)</sup>. İnfüzyon tekniği kullanılarak yapılan ince barsak pasaj grafisi ( enteroclysis ) konvansiyonal tetkiklere oranla mukozal yüzeyi, stenozların lokalizasyonunu ve karakterini göstermede daha üstündür.

İnce barsaklarda çok değişik fonksiyon bozuklukları olabilir. Safra tuzu geri emiliminde azalma, buna bağlı ishal, malabsorbsiyon sorunları karşımıza çıkabilir.

Radyasyon enteriti için tanı koydurucu bir klinik veya laboratuvar testi olmamasına karşın, bu tür hastalarda trombosit sayısı artabilir. Ayrıca serum diamin oksidaz aktivitesinin radyasyon hasarının oranına göre yükseldiği biliniyor. Bu testler tanı koydurucu olmamakla birlikte en azından radyasyon enteritini ince barsağın diğer fonksiyonel bozukluklarından ayırmamızda yardımcı olabilirler.

Akut radyasyon enteritinin tedavisi semptomların kontrolüne yöneliktir. Karın ağrısı ve kramplar antispazmotik ve analjezik ilaçlarla önlenir. İshal opiat türü ve diğer antidiareik ilaçlara genellikle cevap verir. Ağır seyreden vakaların hastaneye yatırılıp oral alımlarının kesilmesi ve sıvı-elektrolit imbalansının düzeltilmesi gerekebilir. Mennie ve ark. <sup>(23)</sup> karın ağrısı ve diarenin önlenmesinde aspirini kullanmışlar ve olumlu etkilerini saptamışlar. Bu olumlu etkiyi 2 nedenle açıklamışlar:

a) Prostaglandin salınımına bağlı düz kas spazmının önlenmesi

b) Trombositlerin yapışmalarını önleyerek mikrovasküler fibrozisi engelleyip mikrosirkülasyonu hızlandırması.

Birçok inflamatuvar olayda olduğu gibi radyasyon enteritinde de steroidler kullanılmış fakat yararı henüz ortaya konulamamıştır <sup>(37)</sup>.

Elemental dietin radyasyon enteritinin akut etkilerini önlemede yararlı olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından öne sürülmüştür <sup>(4)</sup>.

Kronik periodda radyasyon hasarı, malabsorbsiyon, parsiyel veya tam tıkanıklıkla seyreden intestinal striktürler, fistül oluşması ve infarktlarla kendini gösterebilir. Semptomların ortaya çıkması genellikle yavaş ve sinsidir. Fakat bir kez

oluştığı zaman semptomatik gerileme genellikle çok nadirdir. Geç dönemde görülen semptomların malignite nüksünden ayırıcı tanısı oldukça zordur <sup>(37,40)</sup>.

Kronik radyasyon enteritinde hastalar çok değişik semptomlar gösterebilir. Malabsorsiyona bağlı olarak kilo kaybı, karın ağrısı, şişkinlik ve ishal ortaya çıkabilir. Pasaj grafisi inflamatuvar barsak hastalıklarındakileri anımsatır. Hastalara değişik türde dietler yaptırılarak bu şikayetler geriletilebilir fakat tamamen yok etmek hemen hemen imkansızdır. Glutensiz diet kısıtlı bir yarar gösterebilir. Düşük karbonhidratlı, laktozsuz ve yağ kısıtlı bir diet yararlı olabilir. Regional enteritle bu durumun benzerliği Goldstein ve ark.'nın <sup>(14)</sup> sulfasalazin kullanmaya yöneltmiş ve bunun yararını görmüşlerdir.

Radyasyon tedavisi sonrası striktür gelişen hastalar intestinal obstrüksiyonlar ile kendilerini gösterir. Genellikle nazogastrik dekompresyon ile gerileyen epizodik parsiyel obstrüksiyonlar şeklindedir. Bir süre sonra fibrozisin ilerlemesi ile tam obstrüksiyonlar oluşur ve kesin tedavi için genellikle cerrahi girişim gerekir.

Kronik radyasyon enteritinden etkilenen hastaların yaklaşık % 80'ine hayatlarının herhangi bir döneminde cerrahi girişim gerekmektedir. Endikasyonlar genellikle obstrüksiyon, fistül, perforasyon ve kanama nedeni ile koyulur. En sık karşılaşılan ameliyat nedeni obstrüksiyondur <sup>(28,41)</sup>.

Cerrahi girişim olarak yapabilecek üç ayrı teknik mevcuttur.

**a) By-pass**

**b) Geniş rezeksiyon + anastomoz**

**c) Striktüroplasti**

Birçok yayında obstrüksiyon ve fistüller için by-pass, perforasyon ve peritonit için rezeksiyon önerilmektedir. By-pass cerrahisi önerenlerin hemen hemen hepsi mortalite ve morbiditenin rezeksiyona göre daha düşük olduğunu belirtmektedirler (13,48).

Eskiden rezeksiyon ve anastomozun mortalite ve morbiditesinin yüksek olması nedeni ile teknik modifiye edilmiş ve “ geniş rezeksiyon” terimi ortaya atılmıştır<sup>(41)</sup>. Bu yazarlara göre eğer rezeksiyon geniş yapılırsa mortalite ve morbidite by-pass cerrahisi ile aynıdır.

Radyasyon enteritinin cerrahisi açısından bazı prensipler belirlenmiştir ve bu prensiplerde yaygın olarak kabul edilmiştir. Bunlar aşağıda sıralanmıştır:

- a) Gerçekten endike olmadıkça radyasyon görmüş batına girmekten kaçının
- b) Geniş rezeksiyonlardan ve multipl anastomozlardan kaçının
- c) Gerekmedikçe bridektomi yapmayın
- d) Anastomoz ettiğiniz uçlardan mutlaka biopsi yapın
- e) Anastomozu mutlaka işaretleyin
- f) Anastomozu uzun bir tüp ile koruyun ve beslenmeye geç başlayın
- g) Eğer stoma yapmanız gerekiyor ise, cilt seviyesinden 2-2,5 cm. yukarıda olsun.

#### ***4) RADYASYON ENTERİTİNİ ÖNLEME***

Radyasyonun gastrointestinal sistem üzerindeki etkilerini önlemek veya azaltmak için pek çok çalışma yapılmıştır. En popüler olan metodlardan biri ince

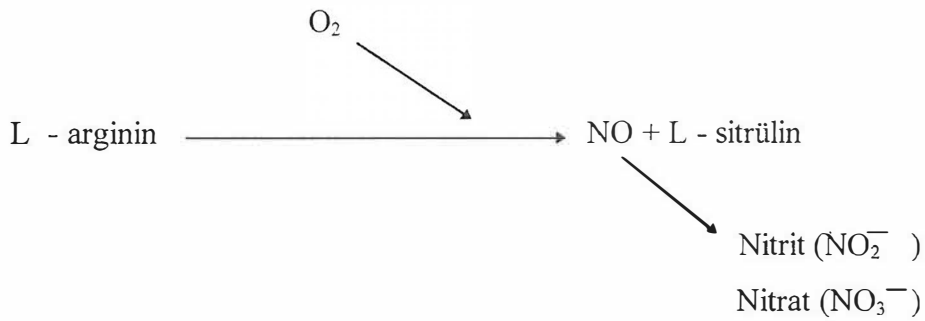
barsakları pelvisten uzaklaştırmaktır. Bu amaç için değişik teknikler uygulanmıştır. Gallagher ve ark. <sup>(12)</sup> başaşağı pozisyonda mesaneyi şişirerek ve batın duvarı kompresyonu sağlayarak ince barsakların pelvisten uzaklaştırılması tekniğini kullanmışlar. Cole <sup>(6)</sup> batın içine nitroz oksid gazı vererek ince barsakların radyasyon alanından uzaklaştırabileceğini tarif etmiştir. Dische ve Dowdell<sup>(11)</sup> pelvis içine 500 ml. silikon enjekte etmişler ve barsakların bu bölgeye ulaşmamasını amaçlamışlardır. Diğer bazı yazarlar ise omentumu kullanarak ince barsakların pelvise inmelerini önlemek için bazı değişik teknikler uygulamışlardır <sup>(5)</sup>. Bunların bazıları omentumu pediküllü bir flap yaparak pelvise doldurmuş, bazıları ise ince barsakları omentum içine sarıp, batın arka duvarına suture etmişlerdir. Bir kısım araştırmacılar ise bazı sentetik maddeleri pelvis üzerine suture ederek barsakların bu bölgeye inmelerini engellemişler <sup>(10)</sup>. Bu amaçla en çok kullanılan materyal absorbe olabilen polyglycolic asit greftidir.

Cerrahi tekniklerin dışında bir çok farmakolojik maddenin radyasyon enteritini önlemede yararlı olabileceği belirtilmiştir. Elemental dietin radyasyon enteritindeki akut etkileri önlediği gösterilmiştir<sup>(4)</sup>. Misoprostolün sitoprotektif etkisi bazı yazarlar tarafından ortaya konulmuş <sup>(9)</sup>. Sulfhydryl thiol WR-2721 üzerinde en çok çalışılan radioprotektif maddedir. Bunun erken ve geç radyasyon enteriti komplikasyonlarını önlediği gösterilmiştir fakat bulantı ve kusma yapması kullanımını kısıtlamıştır. Radyasyon enteritinde glutaminin intestinal koruyucu etkisi üzerinde birçok yazar çalışmıştır ve yüz güldürücü sonuçlar almışlardır <sup>(19,37)</sup>. Bunlar glutaminin radyasyon enteritinde bakteriyel translokasyonu ve histolojik hasarı azalttığını göstermişlerdir. Pankreatik ve intestinal proteaz enzimlerinin nötralize edilmesinin radyasyon hasarını azaltacağını bazı araştırmacılar önermişlerdir<sup>(29)</sup>. Bu amaçla antitripsin özellikli madde elde etmek için soya fasulyesi ve *Ascaris suis* in kütis tabakası kullanılmış <sup>(36)</sup>.

## ***B-NİTRİK OKSİD( NO )***

Nitrik oksid parakrin etki gösteren ve enzimatik olarak L- arginin molekülünden sentezlenen bir moleküldür. NO hem fizyolojik hem de patofizyolojik koşullarda görev alan çok önemli ve benzersiz bir biyolojik mediatördür <sup>(39)</sup>. 1987 yılında Mancado ve ark. <sup>(26)</sup> nitrit oluşumun L-arginin varlığına bağlı olduğunu ve bunun L-arginin analogları tarafından inhibe edilebileceğini göstermişlerdir. Bundan sonraki 10 yıl boyunca nitrik oksid ile ilgili birçok klinik ve deneysel çalışmalar yapılmıştır. Hatta 1992 yılında Science dergisi NO'ı yılın molekülü seçmiştir.

Nitrik oksid pek çok memeli hücresinde sentezlenen bir serbest radikaldir. Çok değişik fizyolojik durumlarda olabileceği gibi, çok sayıda patolojik durumlarda salgılanabilir. Nitrik oksidin ömrü 3-5 saniye gibi kısa bir süredir ve hemoglobin, metilen mavisi ve superoksid anyonu tarafından hızlıca nötralize edilir. Nitrik oksid oluşumunda yer alan enzim grubunun ismi nitrik oksid sentaz ( NOS ) dir. NOS L-arginin'in son guanidin grubunu NO'e çevirir <sup>(1)</sup>. Reaksiyon kofaktör olarak NADPH a gereksinim duyar ve moleküler oksijen kullanarak L-arginini oksidize eder ve sonuç olarak NO ve L-sitrülin oluşur ( Şekil 2 ).



***Şekil 2: Memeli Hücresinde Nitrik Oksid Sentezi***

Nitrik oksid oluşumunu sağlayan NOS enziminin 2 ayrı formu mevcuttur. NOS enzimi bir çok hücre tipinde bulunur. Bunlar özellikle endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, hepatositler, Kupfer hücreleri, trombositler, pankreas  $\beta$  hücreleri ve çeşitli santral nöronlardır. NOS'un iki tipi şunlardır:

a) Constitutive (c NOS) : Değişmeyen

b) Inducible ( iNOS ) : Uyarılabilen

c NOS endotelde, nöronlarda ve trombositlerde bulunur, kalsiyum ve kalmodule bağımlıdır. c NOS herhangi bir uyarı olmaksızın devamlı olarak bazal bir seviyede NO salgılar <sup>(20)</sup>

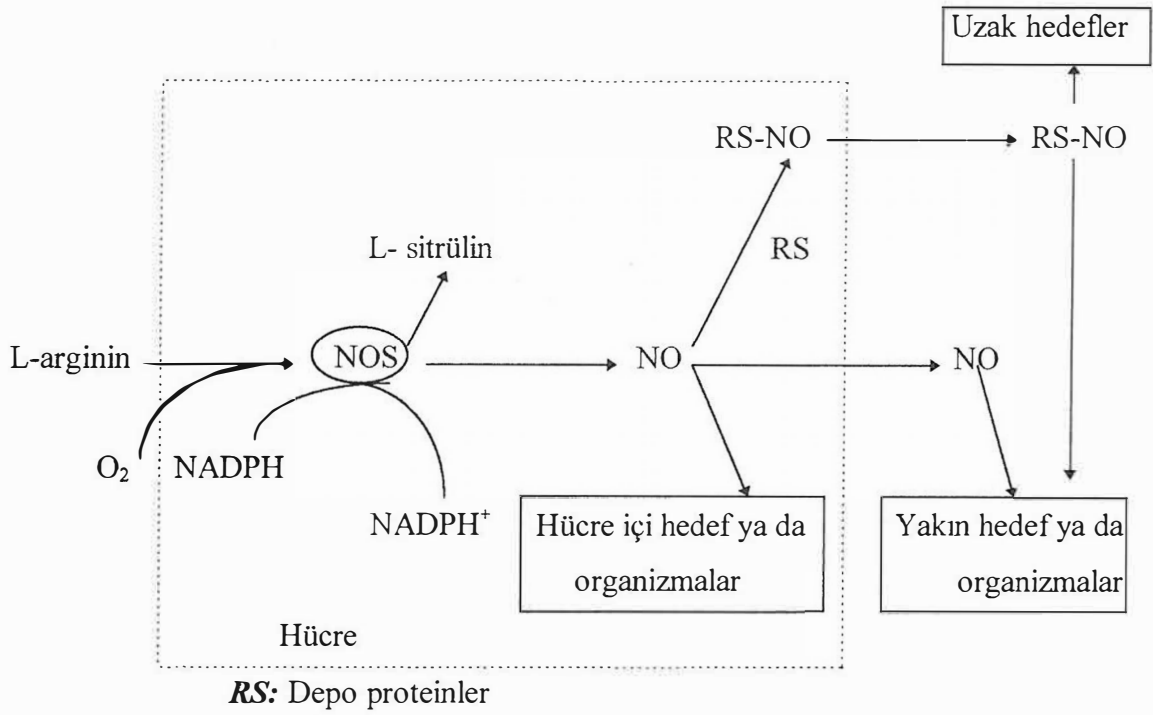
iNOS ise makrofajlar, hepatositler ve damar düz kas hücrelerinde bulunur, endotoksin, interferon-gamma, interlökin-1, tümör nekroz faktörü ( TNF ) gibi sitokinler tarafından verilen uyarılar ile NO üretimine geçer. iNOS kalsiyuma bağımsızdır ve bir uyarı sonucu 4-24 saat civarında aktif kalır ve cNOS 'un ürettiği NO in yüzlerce katından daha fazlasını üretir <sup>(26)</sup>. Glukokortikoidler, tümör growth faktör  $\beta$ , IL-4 ve IL-10 iNOS'u inhibe ederler <sup>(30)</sup>. **Tablo 1** de cNOS ve iNOS' un karakteristik özellikleri gösterilmiştir.

**Tablo I: NOS İzoformlarının Karakteristik Özellikleri**

<b>Ortak Özellikler</b>		
Madde	L-arginin	
Kofaktör	NADPH, FAD, FMN, BH <sub>4</sub>	
Hem gurubu		
<b>Ayrı Özellikler</b>		
	c NOS	i NOS
Salınım	Devamlı	Uyarı sonucu
Hız Kısıtlaması	Kalsiyum / Kalmodalin	Madde / Kofaktör
	Bağlanması	Mevcudiyeti
Ürün Miktarı	Az / aralıklı	Çok / devamlı
NADPH:Nikotinamid adenin dinükleotid	FAD:Flavin adenin dinükleotid	
FMN:Flavin mononükleotid	BH <sub>4</sub> : Tetrahidrobiopterin	
c NOS:Constitutive (değişmeyen) NOS	i NOS : inducible ( uyarılabilen ) NOS	

NO in etkisi daha çok lokal olarak sentezlendiği hücre içinde olmasına karşın, NO özellikle komşuluğundaki ve daha uzağındaki hedef dokulara da bir şekilde ulaşmaktadır. Örneğin, endotelden salınan NO'nin damar düz kas hücresinde gevşeme yapabilmesi için NO'nin hücre membranını geçmesi gerekmektedir. NO oldukça lipofilik bir moleküldür ve membranları özel bir membran transporteri olmadan geçebilir. Yakınındaki dokulara ulaşması bu şekilde açıklanabilir <sup>(1)</sup>.

NO in etki alanı lokal çevre ile sınırlı mıdır? Serbest NO hücreden salınır salınmaz ya hücre içinde ya da dolaşımında hızlıca inaktif hale çevrilir. NO in uzak hedeflere ulaşabilme yolu gösterilmiştir. Buna göre NO, albumin ve glutatyonun eklenmesi ile stabil nitrosthols formunda aktif olarak uzak hedef dokulara taşınır ve orada aktif NO olarak ayrılır. (**Şekil 3**)



**Şekil 3: Nitrik Oksidin Hedef Bölgelere Ulaşma Yolları**

NO üretimini engelleyen veya artıran birçok farmakolojik ajan tarif edilmiştir. Üretimi arttıran maddeler organik nitratlardır ( nitrogliserin, sodyum nitropurid, ve S-nitrothiols). Organik nitratların uzun süredir vazodilatör olarak kullanılmasına rağmen etki mekanizmasında NO in yer aldığı yeni gösterebilmiştir<sup>(20)</sup>.

cNOs ve iNOS'ın inhibitörleri flavoprotein bağlayıcılar, kalmodulin bağlayıcılar, hem bağlayıcılar, arginin analogları ve tetrahidrobiopterin azaltıcı ajanlar olarak sıralanabilir. Kolay kullanılabilir ve bulunabilir olması nedeni ile arginin analogları NO sentezini inhibe edici etkisi nedeniyle yaygın olarak kullanılırlar. Bu analoglar NOS aktivitesinin etkisini L-arginin ile yarışarak kendi üzerlerine çekerler ve NO sentezini önlerler. Bu maddeler NG-nitro-L-arginine

( L-NNA ), NG- methyl-L-arginine ( L-NMMA ) ve NG- nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME ) dir <sup>(39)</sup>.

NO oksijen ile birleşmesi sonucu metabolize olur ve nitrik oksidin son ürünleri olarak bilinen nitrit ( NO<sub>2</sub> ) ve nitrat ( NO<sub>3</sub>) ortaya çıkar. Nitrik oksidin superoksid ile birleşmesi sonucu peroksinitrat, nitrojen dioksid gibi diğer radikaller ortaya çıkabilir <sup>(1)</sup>. NO metabolizmasının son ürünleri yapılan çalışmalarda NO etkisinin azalmasının ya da artmasının değerlendirilmesinde kullanılırlar.

# ***C-NİTRİK OKSİDİN SİSTEMLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ***

## ***1) KARDİOVASKÜLER SİSTEM***

Günümüzde nitrik oksidin kan damarlarının bazal tonusunu regule eden majör fizyolojik madde olduğu çok kuvvetli bir şekilde kabul görmektedir. Normal vasküler tonus, endotelden kaynaklanan vazodilatörlerin ( NO, prostosiklin gibi ) ve vazokonstriktörlerin ( endotelin gibi ) ortak etkileşimleri sonucu belirlenir. Bazal fizyolojik konumda bu vazodilatasyonun lehinedir <sup>(27)</sup>. NO ve prostosiklin ( PGI<sub>2</sub>) düz kas kasılmasını ve proliferasyonunu, trombosit agregasyonunu, endotele trombosit ve monosit yapışmasını inhibe ederler. Ayrıca her ikisinde trombosit disagregasyonunu stimule eder <sup>(27)</sup>.

Renal, kardiak, musküler ve pulmoner vasküler yapılarının bazal regulasyonu NO e bağlıdır. Hatta, azalmış NO aktivitesi primer hipertansiyonun nedeni olarak ileri sürülmüştür <sup>(43)</sup>.

NO in koagulasyon sistemi üzerinde de etkisi vardır. Trombositlerin hem endotel yüzeyine, hem de birbirlerine yapışmalarını önler <sup>(39)</sup>.

## ***2) İMMÜN SİSTEM, İNFLAMASYON VE SEPSİS***

Nitrik oksid immün cevapta da önemli bir rol oynar. NO in kronik ve akut inflamasyonda da çok önemli görevleri olduğuna dair yeterli bilgiler mevcuttur <sup>(33)</sup>. Periferik kan monositleri alveolar makrofajlar, Kupfer hücreleri ve nötrofiller uyarıldıkları zaman NO sentezleyebilirler <sup>(39)</sup>. NO sentezinin inhibasyonu akut inflamasyonunun derecesini azaltacaktır <sup>(30)</sup>. Endotoksik şokta, NO sentezi artar ve bu da hipotansiyon oluşması ile ilgilidir . Bakteriyel endotoksin iNOS'u aktive eder

ve oluşan NO düz kas hücrelerini etkileyerek vazodilatasyon oluşturur, kardiomyositler ve endokard hücreleri üzerine etkileyerek venöz göllenmeyi artırır. Bunun sonucunda kardiak fonksiyon bozuklukları ortaya çıkar<sup>(30)</sup>.

Yakın zamanlarda nonspesifik immünitinin iNOS'un aktive edilmesi ile ilgili olduğu gösterilmiştir<sup>(30)</sup>. Organ transplantasyonlarından sonra rejeksiyon ve "graft versus host" hastalığında da NO seviyesinin yükseldiği gösterilmiştir<sup>(21)</sup>. NO immün sistemi bir mikrobial hastalıkta harekete geçirerek yararlı bir görev yerine getirir fakat diğer inflamatuvar olaylarda da istenmeyen etkilere yol açabilir.**(Tablo 2)**.

**Tablo 2: Nitrik Oksid Sentezinin Artmasının Sonuçları**

	<i>Hastalık</i>	<i>Mekanizma</i>
<i>İstenen</i>	İnfeksiyon	Mikropların öldürülmesi
<i>Etkiler</i>	Sepsis / Endotoksemi	Hücrelerin korunması
<i>İstenmeyen</i>	Septik Şok	Aşırı vazodilatasyon
<i>Etkiler</i>	Otoimmün Hastalık	Doku hasarı
	Kronik İnflamasyon	Doku Hasarı / Karsinogenez

### **3) GASTROİNTESTİNAL SİSTEM**

NO gastrointestinal sistemde bir çok fizyolojik ve patolojik olayda rol alır. NO in gastrointestinal sistemdeki etki mekanizması 3 ana kategoriye ayrılabilir; nörotransmitter, vazorelaksan ve parakrin mediatör<sup>(39)</sup>. NO nonadrenerjik, nonkolinerjik ( NANC ) nörotransmitterlerden birisidir ve gastrik ve intestinal mukoza korunmasında, sepsis ve sirozdaki hemodinamik bozukluğun oluşmasında ve hepatotoksisitenin parakrin mediatörü olarak etkili olduğuna dair bilgiler mevcuttur<sup>(42)</sup>.

**NANC Nöron İletimi** : NANC nöronları gastrointestinal düz kas gevşemesi sağlarlar. Bunun sonucunda özofagus alt sfinkterinde yutkunma esnasında gevşeme, midenin dolması sırasında proksimal mide bölümünde gevşeme, distansiyon sırasında ince barsak kontraksiyonlarında azalma sağlarlar <sup>(16)</sup>. NANC nöronlarının nörotransmitterleri tam olarak belirlenememiş olmasına rağmen vazoaaktif intestinal peptid ( VIP ) ve adenozin trifosfat ( ATP ) in nörotransmitter olduğu yönünde çok önemli bulgular mevcuttur <sup>(16)</sup>. Fakat bugün NO in tek başına veya diğer maddeler ile birlikte NANC nöronlarının en önemli nörotransmitteri olduğuna dair kanıtlar mevcuttur.<sup>(39)</sup> NO, NANC nöronları vasıtası ile özafagus alt sfinkterinde, midede, ince barsaklarda, Oddi sfinkterinde, ileoçekal valvde, kolonda ve anal sfinkterlerde gevşemeye neden olmaktadır.

**Gastrointestinal Mukoza** : Midede, gastrik kan akımında azalmanın akut erezyonlara ve stres ülserlerine neden olduğu bilinmektedir . NOS enzimi gastrik mukozada saptanmıştır ve fizyolojik stres sırasında endojen vazodilatör olarak NO sentezini arttırdığı gösterilmiştir ve bunun sonucunda mukozal kan akımı desteklenmektedir <sup>(42)</sup>. Başka bir deyiş ile NO strese karşı mideyi korumaktadır.

Multisistem organ yetmezliğinde ve bakteriyel translokasyonda, intestinal mukozal bariyerin kaybı neden olarak gösterilmiştir.<sup>(22)</sup> Yakın zamanlarda hayvan modellerinde yapılmış bir çalışma endotoksik şokun bazı etkilerinin, NO'in ince barsak mukozasını koruyucu etkisi sayesinde azaltılabildiğini göstermiştir <sup>(17)</sup> . NO'in ince barsak mukozasını koruyucu etkisi, onun kanlanmasını desteklemesi dışında, endotoksemi esnasında nötrofillerin mukozaya verdiği zararında antioksidan etkisi sayesinde önlemesinden dolayıdır <sup>(42)</sup>.

## ***D- MYELOPEROKSİDAZ ENZİMİ ( MPO )***

Myeloperoksidaz nötrofillerde ve daha az olmak üzere monositler ve makrofajlarda bulunan bir enzimdir. Myeloperoksidaz aktivitesi ölçülerek barsaklardaki inflamasyon derecesi saptanabilir<sup>(2)</sup>. Böylece MPO aktivitesine bakılarak dokulardaki nötrofil infiltrasyonu ve sonucunda akut inflamasyon derecesi hakkında yorum yapılabilir.

In vivo nötrofil infiltrasyonunu saptayabilecek 2 biokimyasal metod mevcuttur. Bunlar:

- a) Radioaktif maddelerle işaretlenmiş hücrelerin ölçülmesi
- b) Miyeloperoksidaz gibi granülosite özgün enzimlerin dokularda ölçülmesidir.

Radioaktif maddelerle işaretlenmiş hücrelerin ölçülmesi kolay olmasına rağmen, nötrofillerin izolasyonu ve saflaştırılması için ex vivo işlemler gerektirdiği için kullanışsızdır. Halbuki dokularda MPO aktivitesinin ölçülmesi aşağıdaki nedenlerden dolayı daha avantajlıdır:

- a) Lökositlerin saflaştırılması ve izolasyonu gibi ön işlemler gerektirmez.
- b) MPO ölçümü daha kolaydır.
- c) İnflamasyonun miktarını sayısal olarak belirler.

## **E-ENDOTOKSEMİ**

Endotoksinler Gram ( - ) bakterilerin hücre duvarındaki lipopolisakkaridlerdir. Normal koşullarda gastrointestinal sistemde bol miktarda endotoksin bulunur. Gastrointestinal sistemdeki mukozal bütünlüğün bozulması, organ perfüzyonunda azalma, safra asitlerinin yokluğu, sekretuar IgA nın azalması gibi nedenler endotoksinlerin sistemik dolaşıma geçerek endotoksemi oluşturmasını sağlar. Sağlıklı organizmanın retiküloendotelial sistemin temizleyici fonksiyonu bozulur ve endotoksemi meydana gelir. Kandaki endotoksin düzeyinin artmasında fonksiyonların ne kadar bozulduğunu gösterebilir <sup>(25)</sup>.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız 1996 yılında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi ( DETAM ) laboratuvarlarında, aynı fakültenin Biokimya, Mikrobiyoloji ve Onkolojik Patoloji Ünitelerinin katkıları ile gerçekleştirildi. Çalışmamızda 70 adet 250-300 gram ağırlığında Wistar-Albino cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. 5 ayrı grup oluşturuldu. Denekler oda ısısında ve metal kafeslerde tutuldu ve beslenmeleri standart sıçan yemi ve musluk suyu ile sağlandı.

Denekler 40 ml/kg Na-thiopental ( intraperitoneal ) ile uyutularak 5'erli gruplar halinde Chisobolt-75 Co-60 cihazı altına yerleştirildi. Toraks ve ekstremiteler korunarak batin bölgesine 71 cGy/dk hızı ile 1000 cGy ışın verildi. Işınlama işlemi takiben denekler kafeslerine konuldu ve beslenmelerine izin verildi.

Radyasyon enteritini engellemek amacı ile çalışmamızda kullandığımız L-NAME ( N-nitro-L-arginin metil ester) ve prednizolon sularının içine katılarak verildi.

**GRUP I ( n:15):** Batin radyasyonu+ standart sıçan yemi ve su

**GRUP II ( n: 15 ):** Batin radyasyonu+ L-NAME ( 500mg/L/gün )

**GRUP III (n:15 ):**Batin radyasyonu + prednol-L ( 200mg/L/gün)

**GRUP IV(n:15):** Batin radyasyonu + L-NAME ( 500 mg/L/gün)

**GRUP V (n.10):** Kontrol grubu olarak ayrıldı. Hiç bir işlem yapılmadı.

II. grupta L-NAME'ye ışınlamanın yapıldığı gün başlandı ve 3 gün boyunca devam edildi. III ve IV. gruplarda prednol-L ve L-NAME ışınlamadan 3 gün önce başlandı ve ışınlama sonrası 3 gün boyunca devam edildi.

Tüm denekler 4. gün sakrifiye edilerek biyokimyasal, mikrobiyolojik ve histopatolojik çalışma için doku ve kan örnekleri alındı.

**Biyokimyasal Araştırma:** Terminal ileumdan 5 cm lik bir segment çıkarıldı ve geriye kalan tüm barsak mezenterinden ayrıldı ve lümeni serum fizyolojik ile irrigе edildi. Barsaklar kuru bir kap içine yerleştirilerek - 70 C<sup>0</sup> de donduruldu.

İnflamasyonun derecesini gösteren myeloperoksidaz enzimi ( MPO ) ve nitrit düzeyi tayinleri aşağıda açıkladığımız yöntemler kullanılarak yapılmıştır.

#### ***A-Myeloperoksidaz Enzimi Tayini:***

***Prensip:*** MPO enzimi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında O-dianisidin dihidrokloridi, ışığı 460 nm'de absorblayan renkli bir bileşiğe oksitler. Oluşan rengin şiddeti ortamdaki MPO aktivitesi ile orantılıdır.

#### ***Ayıraçlar:***

1- % 0,5 lik hegzadesiltrimetil amonyumbromid ( HTAB ): 50 mM' lük fosfat tamponunda hazırlandı, pH= 6.00

2- O- dianisidin dihidroklorid: 16,7 mg 100 ml 50 mM lik potasyum fosfat tamponunda çözüldü.

3- Çalışma ayıracı: Çalışmadan hemen önce 2 numaralı ayıraca 200 mikrolitre % 0,3' lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklendi.

**İşlem:** 0,2 g barsak doku 3 ml % 0,5 lik HTAB de ultraturax ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat 10 saniye sonike edildikten sonra 3 kez dondurulup çözüldü ve 15 dk. 40.000 g de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant enzim tayininde kullanıldı.

2,9 ml çalışma ayırıcı üzerine 0,1 ml süpernatant pipetlenmesini takiben 460 nm de absorbans değişimi  $\Delta A/ dk$  olacak şekilde 4 dk. izlenir.

Sonuçlar U/g olarak ifade edildi <sup>(2)</sup>.

### **B- Nitrit Düzeyi Tayini ( NO<sub>2</sub>):**

**Prensip:** NO asit ortamda nitroz aside dönüşür. Bu bileşikte sülfonilik asitle reaksiyona girerek kırmızı renkli azo bileşiği oluşturur.

### **Ayıraçlar:**

1- 1 M Na OH ( sodyum hidroksit )

2- 1,3 M ZnSO<sub>4</sub> ( çinko sülfat )

3- 0,31 M potasyum fosfat tamponu pH: 7,5

4 - % 1 lik sülfanilamid : % 15 lik fosforik asitle hazırlanmış

5- % 0,1 lik N- ( 1-naftil) etilen diamin

6- Çalışma ayırıcı : Çalışmadan hemen önce 4 ve 5 nolu ayıraçlar eşit hacim karıştırılır.

**İşlem:** 1,15 M lik KCl çözeltisinde % 25 lik barsak dokusu homojenatı hazırlandı. Homojenat 10000 g de 10 dk, + 4 C<sup>0</sup> de santrifüj edilerek kaba

partiküller uzaklaştırıldı. Supernatantın 1 M NaOH ve 1,3 M ZnSO<sub>4</sub> ile proteinsizleştirildi. Elde edilen proteinsizleştirilmiş süpernatantın 50 mikrolitresi üzerine 30 mikrolitre 0,31 M potasyum fosfat tamponu ve 200 mikrolitre çalışma ayıracağı eklendi. 20 dk. karanlık bir ortamda, oda sıcaklığında bekletildi. Oluşan renk 540 nm de okundu. Sonuçlar pmol/mg doku olarak ifade edildi<sup>(45)</sup>.

**Mikrobiyolojik Araştırma:** Sakrifiye edilen deneklerin vena cavalardan 3 cc kan örneği alınarak kuru cam tüplere konuldu. Elde edilen plazmalardan endotoksin düzeyi tayini yapıldı. Bu amaçla E-Toxate (Limulus Amebocyte Lysate) (Sigma Chemicals, USA) kiti kullanıldı. 1 saatlik inkübasyondan sonra tüpte katı jel oluşumu ( +++ ), yumuşak jel oluşumu ( ++ ) hafif jel oluşumu ( + ), jelatin oluşmaması (-) olarak değerlendirildi.

**Histopatolojik Araştırma :** Terminal ileumdan çıkarılan 5 cm lık ince barsak segmentinin lümeni serum fizyolojik ile irrigé edilerek formaldehit içine konuldu. Bu segmentlerden hazırlanan parafin bloklardan yapılan kesitler Hemotoksilen-Eosin ( Alcian blue pH:2,5 safran ) boyası ile boyanarak incelendi. Mukozal bütünlüğü gösteren ve objektif kriterler olarak kabul edilen santimetredeki villus sayısı, villus yüksekliğini incelemek amacı ile ışık mikroskopuna adapte edilen mikrometre kullanıldı.

**İstatistiksel Değerlendirme :** Elde edilen tüm sonuçlar student-t ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak değerlendirildi.

## BULGULAR

Kontrol grubu olarak ayrılan 5. grup dışında kalan gruplarda 3'er tane olmak üzere toplam 12 denek radyasyona bağlı olarak öldü ve çalışma dışı bırakıldı.

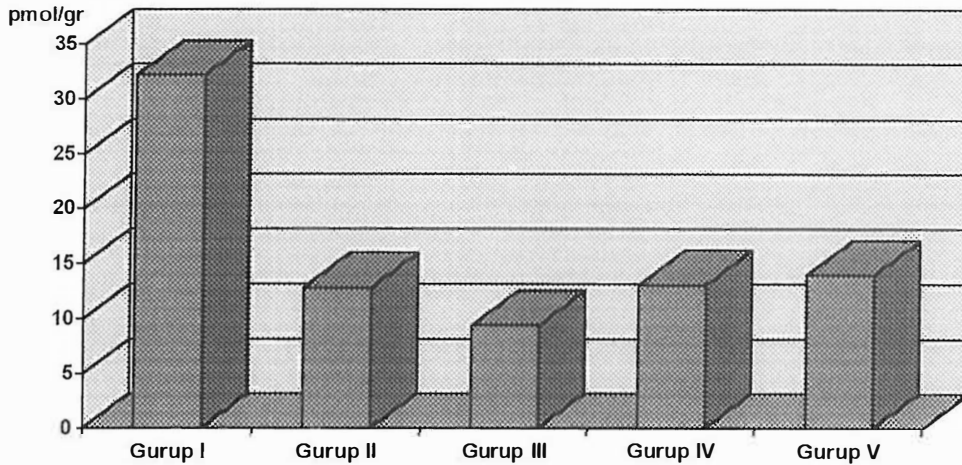
### Biokimyasal Sonuçlar:

İnce barsak nitrit ( $\text{NO}_2$ ) tayinlerinde prednol-L ve L-NAME kullanılan gruplarda  $\text{NO}_2$  düzeylerinin I. gruba göre anlamlı oranda azaldığı saptandı ( $p < 0,05$ ). **Tablo 3'** de ve **Şekil 4'** de  $\text{NO}_2$  değerlerinin gruplara göre dağılımları gösterilmektedir.

**Tablo 3:  $\text{NO}_2$  nin gruplara göre dağılımı**

Guruplar	Ortalama	<i>p</i> değeri
Radyasyon (n:12)	32,16 ± 28,10	-
Rad +L- NAME (n:12)	12,80 ± 11,63	$p < 0,05$
Rad + Prednizolone (n:12)	9,43 ± 5,71	$p < 0,01$
Rad + Önce L-NAME (n:12)	13,05 ± 4,88	$p < 0,05$
Kontrol (n:10)	13,96 ± 9,69	$p < 0,05$

- Karşılaştırmalar I. grup ile yapılmıştır.



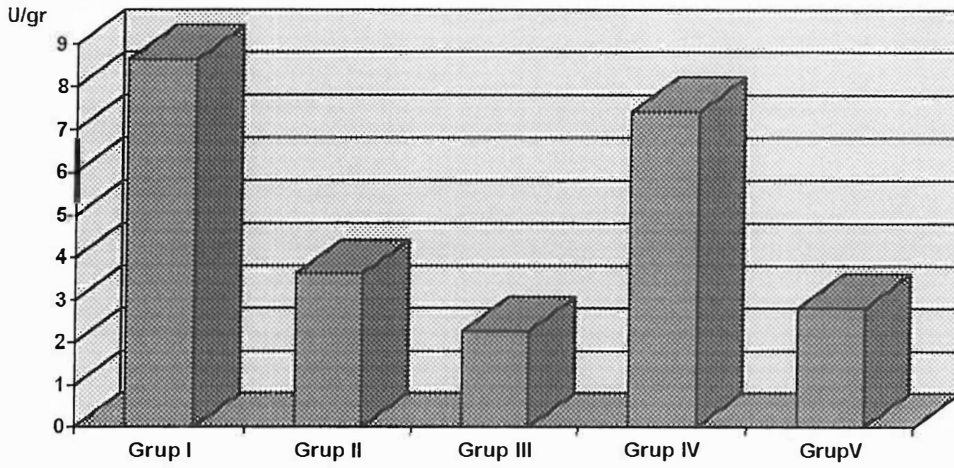
**Şekil 4:  $\text{NO}_2$ ' nin gruplara göre dağılımı**

İnce barsak myeloperoksidaz enzimi tayinlerinde prednol-L ve L-NAME kullanılan gruplarda I grupla karşılaştırmada anlamlı oranda azalma tespit edildi ( $p < 0,001$ ). 3 gün önce L-NAME kullanılan grupta ise anlamlı fark saptanmadı. **Tablo 4** ve **Şekil 5** de myeloperoksidaz enzim düzeylerinin gruplara göre dağılımı gösterilmektedir.

**Tablo 4: MPO' ın gruplara göre dağılımı**

Guruplar	Ortalama	<i>p</i> değeri
<b>Radyasyon (n:12)</b>	8,64 ± 3,38	-
<b>Rad +L- NAME (n:12)</b>	3,62 ± 1,60*	$p < 0,001$
<b>Rad + Prednizolone (n:12)</b>	2,27 ± 1,67*	$p < 0,001$
<b>Rad + Önce L-NAME (n:12)</b>	7,42 ± 2,93**	$p < 0,05$
<b>Kontrol (n:10)</b>	2,81 ± 1,41*	$p < 0,001$

- Karşılaştırmalar I. grup ile yapılmıştır.



**Şekil 5: MPO' ın gruplara göre dağılımı**

## MİKROBİYOLOJİK SONUÇLAR

Hard jel ve soft jel oluşumuna bakılarak endotoksemi pozitifliği değerlendirilen deneklerden I. grupta % 58 ( 7/12 ), II grupta % 25 ( 3/12 ), III. grupta % 42 ( 5/12 ), IV. grupta % 25 ( 3/12), V. grupta % 0 ( 0/ 10 )denekte pozitif olarak belirlendi. Endotoksemi saptanan deneklerin gruplara göre dağılımı **Tablo 5'** de gösterilmiştir.

**Tablo 5: Endotoksin düzeylerinin gruplara göre dağılımı**

Denek No	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
1	+++	++	-	++	-
2	++	-	-	-	-
3	-	-	++	+++	-
4	-	-	++	-	-
5	+++	++	-	-	-
6	++	-	++	+	-
7	++	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-
9	+++	-	++	-	-
10	+++	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
Endotoksemi oranı	7/12	3/12	5/12	3/12	0/10
<i>p</i> değeri	-	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

+++; Katı jel ++; Orta sertlikte jel +; Yumuşak jel -; jel oluşumu yok

Grupların grup I ile karşılaştırmaları sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (  $p < 0,05$  ).

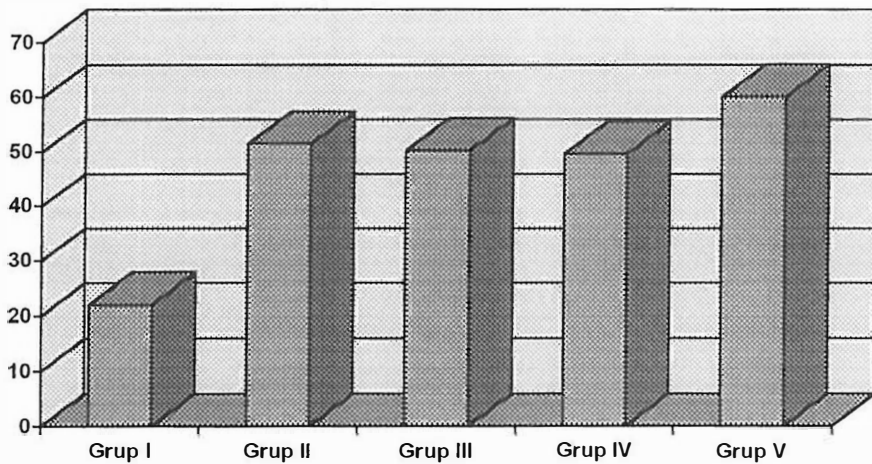
## HİSTOPATOLOJİK SONUÇLAR

Santimetredeki villus sayısı ve villus yüksekliği ölçülerek yapılan mukozal morfolojik çalışmada sadece radyasyon verilen I. grupta mukozal bütünlüğün tama yakın bozulduğu saptandı. Prednol-L ve L-NAME kullanılan II., III. ve IV. gruplarda ise mukozal bütünlüğün kısmen korunduğu gözlemlendi. Prednol-L ve L-NAME gruplarında biokimyasal sonuçların aksine L-NAME grubunun sonuçlarının daha anlamlı olduğu belirlendi. **Tablo 6 ve 7'** de santimetredeki vilüs sayısının, ve yüksekliğinin gruplara göre dağılımı gösterilmektedir. Ayrıca **Resim I, II, III, IV, V, ve VI'** da gruplara göre villus morfolojisi gösterilmektedir.

**Tablo 6 : Gruplara Göre Santimetrede Villus Sayıları**

Gruplar	Ortalama	<i>p</i> değeri
Radyasyon (n:12)	22,00 ± 3,67	-
Rad +L- NAME (n:12)	51,42 ± 2,97	$p < 0,001$
Rad + Prednizolone (n:12)	50,17 ± 2,69	$p < 0,001$
Rad + Önce L-NAME (n:12)	49,58 ± 2,39	$p < 0,001$
Kontrol (n:10)	60,10 ± 4,61	$p < 0,001$

- Karşılaştırmalar I. grup ile yapılmıştır.

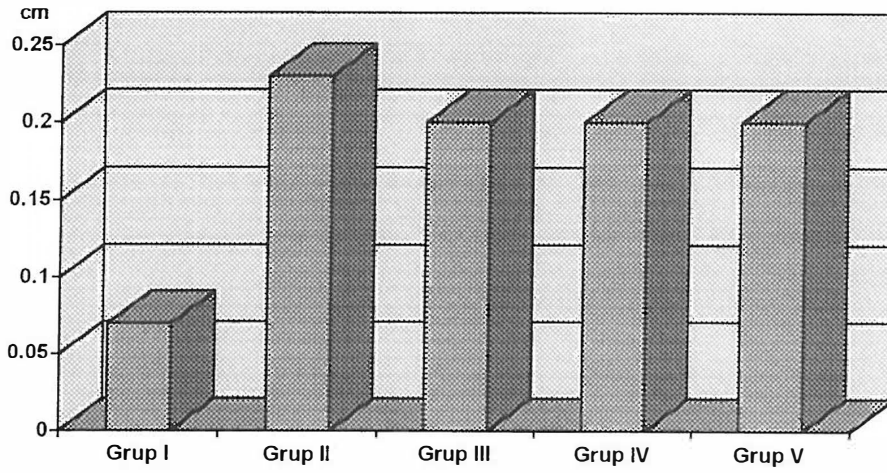


**Şekil 6: Gruplara Göre Santimetrede Villus Sayıları**

**Tablo 7 Guruplardaki Villus Yükseklikleri**

<b>Gruplar</b>	<b>Ortalama</b>	<b><i>p</i> değeri</b>
<b>Radyasyon (n:12)</b>	0,07±0,02	-
<b>Rad +L- NAME (n:12)</b>	0,23±0,03	p < 0,001
<b>Rad + Prednizolone (n:12)</b>	0,20±0,02	p < 0,001
<b>Rad + Önce L-NAME (n:12)</b>	0,20±0,02	p < 0,001
<b>Kontrol (n:10)</b>	0,20±0,02	p < 0,001

- Karşılaştırmalar I. grup ile yapılmıştır.



**Şekil 7; Guruplardaki Villus Yükseklikleri**

*Resim I- Radyasyon enteriti oluşturulan I. grubun villuslarında belirgin atrofi*

*Resim II- Grup I'de villus yüksekliklerinde belirgin kısıalma ve yapılarında bozulma*

*Resim III-Radyasyonla birlikte L-NAME verilen grupta villus yapılarının kısmen korunduğu gör÷lmektedir*

*Resim IV- Üç gün önce Prednol verilen grupta villuslarda hafif basıklaşma ve atrofi gör÷lmektedir*

**Resim V-Üç gün önce L-NAME başlanan grupta villus yapılarının korunduğu görülmektedir**

**Resim VI-Normal ince barsak villus yapısı görülmektedir**

## *TARTIŞMA*

L -arginin semiesansiyel bir aminoasit olup büyüme, hastalık ve stres koşullarında esansiyel aminoasit konumuna gelir. L - arginin, 1992 de yılın molekülü seçilen nitrik oksidin (NO) biosentetik prekürsörüdür. Nitrik oksidin bilinen en önemli fizyolojik fonksiyonu vazodilatasyon ve nörotransmitter etkisidir. Nötrofil, makrofaj ve T lenfositlerinin aktivasyonu büyük miktarda NO salınımına neden olur <sup>(27)</sup>. Nitrik oksidin geçmiş yıllarda tanımlanan EDRF (endothelium derived relaxing factor) olduğu ortaya çıkarılmıştır <sup>(27)</sup>.

Aktive olan nötrofiller vasküler endotele yapışarak süperoksid üretimini sağlar ve bu mikrovasküler disfonksiyonda ilk adım olarak kabul edilir. Bu olayın diğer tanımı inflamasyon başlangıcıdır. Nitrik oksid sentezinin artmasının nötrofillerin endotele yapışmasını ve süperoksid sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir. İn vitro çalışmalarda EDRF ve nitrik oksidin endotel hücrelerine nötrofil adhezyonunu ve süperoksid anyon üretimini azalttığı gösterilmiştir <sup>(27,30)</sup>.

Ceruleine bağlı akut pankreatit oluşturulan hayvan modellerinde oluşan ARDS'de nitrik oksid sentezinin etkileri incelenmiştir. Deneklere arginin analogları verilip nitrik oksid sentezi engellenerek nötrofil infiltrasyonu azaltılmış ve pulmoner hasarın histopatolojik olarak daha fazla olduğu gösterilmiştir <sup>(34)</sup>. Bu çalışmada nitrik oksidin faydalı etkisi direkt vazodilatasyon yapma özelliğine bağlanmıştır. Vazodilatasyon etkisi ile intrapulmoner şant oluşumu, intraarterial hipoksi ve pulmoner arteriyel hipertansiyon azaltılarak ARDS gelişimi önlenmiştir.

Nitrik oksid sentezinin artmasının akut pankreatitte gelişen ARDS'yi engelleyici etkisi olmasına karşın inflamasyonu başlatıp arttırdığı bilinmektedir.

Deneyisel kolit oluşturulan deneklerde nitrik oksid sentezinin arttığı gösterilmiştir <sup>(32)</sup>. İnflamatuvar barsak hastalıklarında interlökin 1, TNF,  $\alpha$  ve gamma interferon gibi sitokinlerin ve endotoksinlerin uyarımı ile nitrik oksid sentaz enzimi artar ve bu da nitrik oksid sentezini hızlandırır <sup>(26)</sup>. Dolaşımdaki nitrik oksid miktarının artması sistemik inflamatuvar cevabın bozulmasına neden olur. Nitrik oksid sentezini engellemek amacı ile arginin analogu olan L- NAME, nitrik oksid sentaz aktivitesini üzerine çekerek arginin ile yarışır ve nitrik oksid sentezini engeller <sup>(39)</sup>.

Bu temel bilgidен yararlanarak deneyisel kolit oluşturulan deneklere topikal L- NAME, L- arginin ve prednol kullanılmış, nitrik oksidin yıkım ürünleri olan nitrit ve nitratın L- NAME kullanılan grupta anlamlı oranda azaldığı belirlenmiştir. Kolon mukozasındaki hasarı değerlendirmek amacı ile makroskopik skorlama yapılmış ve L- NAME grubunda hasarın daha az olduğu saptanmıştır <sup>(32)</sup>.

Nitrik oksid sentezinin inhibe edilmesinin inflamatuvar olaylardaki faydalı etkilerinin yanında septik şoktaki etkisi daha karmaşıktır. Endotoksik şokta makrofaj, endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri hatta miyokard hücrelerinden nitrik oksid sentaz enziminin aktivasyonu ile endotoksin ve sitokinler salınır (TNF, interferon gamma gibi) <sup>(22)</sup>. Nitrik oksidin artması ile hipotansiyon, kan akımında düzensizlik ve miyokardial depresyon görülür. Nitrik oksid sentaz enziminin inhibasyonu ile hipotansiyon geriye döndürülebilir <sup>(3,30)</sup>. Ancak yapılan çalışmalarda bunların dışında faydalı etki gösterilememiştir. Tersine nitrik oksid sentezinin inhibe edilmesi ile organ kan akımında azalma, septik şoklu hayvanların mortalitesinde artma görülmüştür <sup>(38)</sup>.

Mulder ve ark<sup>(31)</sup> nitrik oksid sentaz enziminin inhibisyonu ile organ perfüzyonunun azaldığını, kalp, pankreas, mide, barsak, böbrek ve cilt de vasküler dirençde artma olduğunu vurgulamışlardır.

Bu bilgileri destekleyen sonuçları olan ve köpeklerde endotoksik şok oluşturularak yapılan bir deneysel çalışmada deneklere nitrik oksid donörü olan SIN - 1 (3 - mopholinosydnonimine) infüzyonu yapılmıştır. Düşük dozlarda kardiak indeksin arttığı, yüksek dozlarda ise azaldığı saptanmıştır. Sistemik ve pulmoner vasküler direncin düşük dozlarda azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre endotoksik şok sırasında organ kan akımını sağlamada en önemli maddenin nitrik oksid olduğu vurgulanmaktadır<sup>(50)</sup>.

Nitrik oksid sentezinin inhibisyonu ile inflamasyonun engellendiğini gösteren deneysel çalışmalar kolit oluşturulan hayvan modellerinde kullanılmış, sonuçta ülseratif kolit tedavisinde klinikte kullanılabilirliği gündeme getirilmiştir.

Nitrik oksid ile kliniğe yönelik çalışmaların az olması nedeni ile literatür taramalarında örneğine rastlamadığımız radyasyon enteriti ve nitrik oksid arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçladık.

Abdominal radyasyonunun barsak metabolizmasına ve fonksiyonuna olumsuz etkileri ve bunun sonucunda ortaya çıkan bakteriyel translokasyon hayvan modellerinde gösterilmiştir<sup>(1,19)</sup>. Bu olumsuz etkileri engellemek amacı ile nonesansiyel bir amino asit olan glutamin kullanılmış, santimetredeki villus sayısı, villus yüksekliği ve vilus genişliği ile saptanan mukozal morfometrinin anlamlı oranda korunduğu bildirilmiştir. Bakteriyel translokasyon oranlarında ise glutamin kullanılmayan grupta %70, kullanılan grupta ise %30 oranında translokasyon tespit edilmiştir. Mukozal fonksiyonun incelenmesinde ise mukozal ağırlık ve mukozal

DNA içeriğinde iki grup arasında anlamlı fark görülemezken, mukozal protein içeriğinde glutamin kullanılan grupta anlamlı korunma saptanmıştır<sup>(19)</sup>.

Çalışmamızda L - arginin analogu olan L - NAME kullanılan gruplarda nitrik oksid yıkım ürünü olan nitritin miktarlarında azalma, nötrofil aktivitesini gösteren myeloperoksidaz miktarlarında düşme tespit edildi.

Histopatolojik incelemede ise santimetredeki villus sayısı ve yüksekliği L - NAME kullanılan gruplarda kontrol grubuna yakın değerler olarak elde edildi. Antienflamatuar etkisi bilinen prednol - L'de çalışmamızda L - NAME gruplarına benzer sonuçlar vermiştir. Endotoksin tayinlerinde ise L - NAME gruplarında en anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Nitrik oksid sentezinin inhibe edilmesi ile endotoksin miktarındaki azalma prednol - L grubunda görülmemektedir. Radyasyon enteritinde mukozal hasara bağlı gelişen olumsuz etkiler nitrik oksid sentezinin inhibe edilmesi ile azalmaktadır. L - arginin analogu olan L - NAME nitrik oksid sentaz enziminin aktivitesini üzerine çekerek L - arginin ile yarışmaya girmekte ve nitrik oksid sentezini inhibe etmekte ve antienflamatuar etkisini radyasyon enteritinde de göstermektedir.

2,4,6 - trinitrobenzene sulphonic asit (TNBS - E) ile oluşturulan deneysel kolit ve ileit modellerinde L - NAME nin olumlu etkilerinin kullanılan doz ile doğru orantılı olarak arttığı gösterilmiştir<sup>(24)</sup>. Çalışmamızda tek doz kullanılan L - NAME den elde edilen sonuçlar yüksek doz L - NAME kullanımı ile daha olumlu bulunabilir.

Güncel bir konu olduğuna inandığımız nitrik oksid sentezinin inhibisyonu ile antienflamatuar etkinin radyasyon enteriti oluşturulan hayvan modellerinde gösterilmesi L - NAME gibi inhibitör maddelerin klinikte kullanılabilirliğini düşündürmektedir.

## ***SONUÇLAR***

- Nitrik oksid L - argininden nitrik oksid sentaz enzimi aracılığı ile sentez edilir.
- Nitrik oksid ile EDRF un aynı molekül olduğu ortaya çıkarılmıştır.
- Nitrik oksid sentezinin inhibe edilmesi septik şokta olumsuz etkiler gösterirken, inflamatuvar olaylarda olumlu etkiler vermektedir.
- Nitrik oksid sentezini inhibe eden L - NAME nin radyasyon enteritinde kullanımı;
  - Endotoksin düzeyinde azalma,
  - Nitrik oksid yıkım ürünü olan nitrit düzeyinde azalma,
  - İnflamasyonu gösteren myeloperoksidaz düzeyinde azalma,
  - Mukozal morfometri de (villus sayısı, yüksekliği,) korunma görülmektedir.
- L - NAME'nin, radyasyon enteritindeki olumsuz etkileri azaltıcı özelliği hastalığın tedavisinde yeni bir bakış açısı doğurmaktadır.

## ***KAYNAKLAR***

- 1) Billiar T.R.: Nitric oxide; novel biology with clinical relevance. *Ann Surg* 221: 339, 1995.
- 2) Bradley P.P., Priebat D.A., Christensen R.D., et al: Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78: 206,1982.
- 3) Brady A.J., Paole- Wilson P.A.: Circulatory failure in septic shock. Nitric oxide: too much of a good thing? *Br heart J* 70: 103, 1993.
- 4) Brown M.S., Buchanan R.B., Karren S.J.: Clinical observations on the effects of elemental diet supplementation during irradiation. *Clin Radiol* 31: 19, 1980.
- 5) Chai H.J., Lee H.G. : Effect of omental pedicle hammock in protection against radiation- induced enteropathy in patients with rectal cancer, *Dis Colon Rectum* 38: 276, 1988.
- 6) Cole H. : Displacement of small bowel from pelvic radiation field. *Lancet* 8624: 1341, 1988.
- 7) De Cosse J. J., Rhodes R.S., Wentz W.B., et al: The natural history and management of radiation induced injury to the gastrointestinal tract, *Ann Surg* 170: 369, 1969.
- 8) De Cosse J.J.: Radiation injury to the intestine. In Sabiston D.C. Jr ( ed ): *Textbook of Surgery*, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1991 pp 880- 884.
- 9) Delaney J.P., Bonsack M.E., Felemovicius I.: Misoprostol in the intestinal lumen protects against radiation injury of the mucosa of the small bawel. *Radiat Res* 137: 405, 1994.

- 10) Devereux D.F., Chandler J.J., Eisenstat T., et al : Efficacy of an absorbable mesh in keeping the small bowel out of the human pelvis following surgery. *Dis Colon Rectum* 31: 17,1988.
- 11) Dische S., Dowdell J.W.: A method to reduce radiation injury to intestine: A preliminary report. *Radiat Oncol* 1: 277, 1984.
- 12) Gallagher M.J., Brereton H.D., Rostock R.A.; et al: A prospective study of treatment techniques to minimize the volume of pelvic small bowel with reduction of acute and late effects associated with pelvic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12: 1565,1986.
- 13) Galland R.B., Spencer J.: Natural history and surgical management of radiation enteritis. *Br J Surg* 74: 742, 1987.
- 14) Goldstein F., Khoury J., Thorton J.J. : Treatment of chronic radiation enteritis and colitis with salicylazosulfapyridine and systemic corticosteroids: A pilot study. *Am J Gastroenterol* 65: 201, 1976.
- 15) Hasletan P.S., Carr N., Schafield P.F.: Vascular changes in radiation bowel disease. *Histopathology* 9: 517, 1985.
- 16) Hoyle C.H.V., Burnstack G.: Neuromuscular transmission in the gastrointestinal tract. In Rauner B., Wood J., Shultz S. ( ed ). *Handbook of physiology. The Gastrointestinal System. Motility and Circulation.* Bethesda, Maryland: American Physiological Society. 1989 pp 435 - 464.
- 17) Hutcheson I.R., Whittle B.J.R., Baughton-Smith N.K.: Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin - induced acute intestinal damage in the rat. *Br J Pharmacol* 101:815, 1990.

- 18) Jacobs L.G.; Unusual case of late irradiation damage to the ileum. *Radiology*. 80: 57,1963.
- 19) Klimberg V.S., Souba W.W., Dolson D.J., et al: Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. *Cancer* 66: 62, 1990.
- 20) Kuo P.C., Schaefer R.A.: The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg* 221: 220, 1995.
- 21) Langrehr J.M., Murase N., Marks P.M., et al: Nitric oxide production in host-versus-graft and graft-versus-host reactions in the rat. *J Clin Invest* 90:679, 1992.
- 22) Meakins J.L., Marshal J.C.; The gastrointestinal tract: the “motor” of MOF. *Arch Surg* 121:197, 1986.
- 23) Mennie A.T., Dalley W.M. Dinneen W.1., et al: Treatment of radiation induced gastrointestinal distress with asetylsalicylate. *Lancet* 2: 942., 1975.
- 24) Miller M.J.S., Krowicka H.S., Chotinaruemol S., et al: Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition, *J Pharmacol Exper Ther* 264:11, 1993.
- 25) Minnard E.A., Shau J., Noama H., et al: Inhibition of nitric oxide synthase is detrimental during endotoxemia. *Arch Surg* 129: 148, 1994.
- 26) Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109, 1991.
- 27) Moncada S., Radomski M.W., Palmer R.M.J.: Endothelium derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 37: 2495, 1988.

- 28) Margenstern L., Thompson R., Friedman N.: The modern enigma of radiation enteropathy: Sequelae and solutions, *Am J Surg* 134: 166, 1977.
- 29) Margenstern L., Hiatt N.: Injurious effect of pancreatic secretions on postradiation enteropathy. *Gastroenterology*, 53: 923, 1967.
- 30) Morris S.M.Jr., Billiar T.R.: New insights in to the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 266: 829, 1994.
- 31) Mulder M.F., Van Lambolgen A.A., Huisman E., et al: Protective role of NO in the regional hemodynamic changes during acute endotoxemia in rats. *Am J Physiol*, 266: 1558, 1994.
- 32) Neilly P.J.D., Kirk S.J., Gardiner K.R; et al: Manipulation of the L - arginine - nitric oxide pathway in experimental colitis. *Br J Surg* 82: 1188, 1995.
- 33) Nussler A.K., Billiar T.R.: Inflammation, immune regulation and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol*, 54: 171, 1993.
- 34) O'Danovan D.A., Kelly C. J., Abdih H., et al: Role of nitric oxide in lung injuries associated with experimental acute pancreatitis, *Br J Surg*, 82: 1122, 1995.
- 35) Otchy D.P., Nelson H.: Radiation injuries of the colon and rectum, *Surg clin north am.* 73: 1017, 1993.
- 36) Rachoetin S., Shapira S., Yamakawa T. et al: Potent antiproteases derived from *Ascaris lumbricoides*: efficacy in amelioration of post radiation enteropathy. *Gastroenterology* 62: 796, 1972.

- 37) Resnick D.J., Sharp K.W., Imbembo A.L.: Radiation enteritis. In Zuidema G.D. (ed). Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1991, pp 585 - 607 vol:5.
- 38) Robertson F.M., Offner P.J., Ciceri D.P., et al: Detrimental hemodynamic effects of nitric oxide synthase inhibition in septic shock. Arch Surg, 129: 149, 1994.
- 39) Rodeberg D.A., Chaet M.S., Bass R.C., et al: Nitric oxide: An overview, Am J Surg, 170: 292, 1995.
- 40) Rubin P., Casarett G.W.: Clinical Radiation Pathology. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1968.
- 41) Smith S.T., Seski J.C., Copeland L.J., et al: Surgical management of irradiation induced small bowel damage, Obstet Gynecol 65: 563, 1985.
- 42) Stark M.E., Szurszewski J.H.: Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. Gastroenterology, 103: 1928, 1992.
- 43) Tolins J.P., Palmer R.M.J., Moncada S. et al: Role of endothelium derived relaxing factor (EDRF) in regulation of renal hemodynamic responses. Am J Physiol 258: H655, 1990.
- 44) Trier J.S., Browning T.H.: Morphologic response of the mucosa of the human small intestine to x - ray exposure. J Clin Invest 45: 94, 1966.
- 45) Van Dijk A.P.M., Kauskamp Z.J., Wilson J.H.P., et al: Sequential release of cytokines, lipid mediators and nitric oxide in experimental colitis. Mediat Inflamm 4: 186, 1995.

- 46) Walsh D.: Deep tissue traumatism from Roentgen ray exposure. Br Med J 2:272, 1897.
- 47) Warren S., Nathan B.F.: Pathology and pathologic diagnosis of radiation lesions in the gastrointestinal tract, Am J Pathol 18: 499, 1942.
- 48) Wobbes T., Verschueren R.C.J., Lubbers E.J.C., et al: Surgical aspects of radiation enteritis of the small bowel. Dis Colon Rectum 27: 89, 1984.
- 49) Yeoh E. K., Horowitz M.: Radiation enteritis. Surg Gynecol Obstet 165: 373, 1987.
- 50) Zhang H., Ragiers P., Friedman G.: Effects of nitric oxide donar SIN - 1 on oxygen availability and regional blood flow during endotoxic shock. Arch Surg 131: 767, 1996.