

DENEYSEL AKUT PANKREATİT MODELİNDE GELİŞEN AKCİĞER HASARINA ANTİTROMBİN III'ÜN ETKİSİ*

Faruk Önder AYTEKİN¹, Koray TEKİN¹, Burhan KABAY¹, Mehmet TEKİN¹, Atilla ÖZER¹, Yıldız GÜNEY², Akın ÖZDEN¹

ÖZET

Amaç: Akut pankreatitte gelişen akciğer hasarına Antitrombin III'ün etkisi araştırıldı.

Yöntem: 30 adet rat üç gruba ayrıldı (n=10). Grup I (Kontrol grubu): Laparotomi ve bilio-pankreatik kanal hazırlığı yapıldı. Grup II (Akut pankreatit grubu):Bilio-pankreatik kanal bağlanarak akut pankreatit ve akciğer hasarı oluşturuldu. Grup III (Tedavi grubu): Bilio-pankreatik kanal bağlandı ve Antitrombin III verilerek akciğer dokusunun ıslak/kuru ağırlık oranı ve miyeloperoksidaz aktivitesindeki değişimler ölçüldü.

Bulgular: Grup II ve III de miyeloperoksidaz aktivitesi ve ıslak/kuru ağırlık oranındaki artış kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek saptandı (p<0.0001). Grup III de miyeloperoksidaz ve ıslak/kuru oranında azalma görüldü. Fakat bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Sonuç: Literatürde deneysel iskemi-reperfüzyon ve sepsis modellerinde gelişen akciğer hasarı üzerine olumlu etkileri bildirilen Antitrombin III'ün, çalışmamızda oluşturulan pankreatite bağlı akciğer hasarını kısmen azalttığı, fakat bu etkinin iskemi-reperfüzyon ve sepsis modellerine göre çok daha sınırlı kaldığı görülmektedir. Bu da pankreatite bağlı akciğer hasarının oluşum mekanizmasında etkili başka faktörlerin olabileceğini düşündürmektedir. Bu konuda altta yatan mekanizmaları aydınlatmak için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: akut pankreatit, akciğer hasarı, Antitrombin III

The effects of Antitrombin III on Lung Injury in a Model of Experimental Acute Pancreatitis

SUMMARY

Background: Acute pancreatitis, especially in the severe form, is a well-known disease causing both local intra-abdominal and remote organ disturbances, including lungs. As a natural inhibitor of serine proteases, antithrombin was previously shown to attenuate the tissue damage after ischemia-reperfusion, sepsis, and shock in several organ systems. Here, we examined the effects of antithrombin on pulmonary injury in a rat acute pancreatitis model.

Methods: Thirty male Wistar-Albino rats underwent median laparotomy and randomized into three groups: group I (control) bilio-pancreatic duct was dissected but not ligated (n=10), group II (acute pancreatitis group) bilio-pancreatic duct was ligated (n=10), and group III (AT treated group) AT III 250 U/Kg was injected following bilio-pancreatic duct ligation (n=10). After observation time (48 hours) animals were sacrificed and myeloperoxidase activity together with tissue wet/dry ratio in the lung parenchyma were assessed and compared.

Results: There was a statistically significant increase in the quantity of myeloperoxidase activity and tissue wet/dry ratio of lungs in the acute pancreatitis group when compared to the control group. Treatment of animals with antithrombin partly reduced the pulmonary injury characterized by increased tissue wet/dry ratio and myeloperoxidase activity. But this reduction was not found to be statistically significant.

Conclusion: Beneficial effects of AT in preventing pulmonary injury following experimental models of sepsis and ischemia-reperfusion have been reported previously. In our model of experimental acute pancreatitis, AT showed some attenuating effect on pulmonary injury despite it was limited when compared to that of ischemia-reperfusion and sepsis models. This result suggests that some other confounding factors may be involved in the mechanisms of pulmonary injury related to acute pancreatitis. We believe that further detailed studies are needed to elucidate the exact mechanisms of that injury.

Key Word: acute pancreatitis, lung injury, Antitrombin III

Modern tıptaki gelişmelere rağmen akut pankreatit (AP) mortalite ve morbidite kaynağı olarak önemini korumaktadır. Zira akut pankreatit ve komplikasyonlarının tedavisinde etkin bir yöntem ortaya konulamamıştır. Halen AP'te organ yetmezlikleri ve ağır metabolik bozukluklar gibi ciddi komplikasyonlar vakaların %20 sinde ortaya çıkmakta ve bunların morbidite ve mortalitesi % 40

gibi yüksek oranlara ulaşmaktadır¹. Şiddetli AP olgularının %20'sinde adult respiratuar distress sendromu (ARDS) görülmektedir. AP de ilk hafta içindeki mortalitenin %60'ı akciğer disfonksiyonuna bağlıdır^{2,3}.

Antitrombin III (AT) trombin ve faktör IX, Xa, XIa, XIIa gibi diğer serin proteazların en güçlü doğal fizyolojik inhibitörüdür. AT'nin sepsis modellerindeki

* Bu çalışma "38th Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR) Ghent, Belgium, May 28-31, 2003" de sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

¹Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi ABD., DENİZLİ

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya ABD., ANKARA

akciğer hasarını ve iskemi-reperfüzyon sonrası uzak organ hasarını engelleyici etkileri deneysel olarak gösterilmiştir⁴. AT'nin etki mekanizması tam olarak anlaşılammakla birlikte, trombin blokajı ile lökosit-endotel etkileşimi üzerine etkileri ve ikincil olarak sitoprotektif bir ajan olan Prostaglandin I₂'nin artışına neden olarak uzak organ hasarını engellediği bildirilmiştir^{4,8}.

Bu çalışmada deneysel akut pankreatit modelinde oluşan akciğer hasarına AT'ün etkili olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada ağırlıkları 280-340 gram arasında değişen 30 adet Wistar Albino cinsi erkek rat kullanılmıştır. Çalışmaya alınan hayvanlar üç gruba ayrılmıştır. Tüm gruplarda anestezi için ketamine (Ketalar® Eczacıbaşı İstanbul-Türkiye) 50 mg/kg dozunda intramusküler, xylazine (Rompun® Bayer-Türk İstanbul-Türkiye) 10mg/kg dozunda intramusküler olarak kullanıldı. Povidone iodine solusyonuyla karın ön duvarı temizlenerek, steril şartlar altında 3 cm'lik orta hat insizyonu ile karına girildi. Kontrol grubunda (n=10) duodenum mobilize edilerek bilio-pankreatik kanal bulundu. Pankreatit grubunda (n=10) duodenum mobilize edilerek bilio-pankreatik kanal bulunup, kanalın duodenuma giriş yeri 4/0 ipek ile bağlandı. Tedavi grubunda (n=10) bilio-pankreatik kanal, duodenuma giriş yerinden bağlandı. Vena cava inferiorundan 250 IU/kg dozunda Antitrombin III (Kybernin® P500 flakon Centeon Pharma GmbH Marburg-Germany), 26 G x ½ insülin enjektörüyle girilerek fasya 3/0 devamlı sütürlerle, cilt 3/0 tek tek sütürlerle kapatıldı. Her üç gruba operasyon sonrası 2 x 10 ml Ringer's laktat solüsyonu cilt altına verildi.

Örneklerin Alınması

Hayvanlar 48 saat sonra anestezi altında tekrar ameliyata alındı. Göğüs boşluğu açılarak akciğerler çıkartıldı ve hayvanlar sakrifiye edildi.

Akciğer Ödemi

Yaş/kuru ağırlık oranı kullanılarak akciğer ödemi değerlendirildi. Akciğer sol lobu bu ölçüm için kullanıldı. Sol lob tartılarak yaş ağırlık olarak kaydedildi. Daha sonra bu dokuların fırında 90°C de 24 saat kuruması beklendi. Daha fazla ağırlık değişiminin olmadığı tesbit edilince dokular tekrar tartılarak kuru ağırlık sonuçları elde edildi.

Akciğer Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi

Lökosit aktivasyonunun göstergesi olarak doku MPO aktivitesi ölçümü kullanıldı. Akciğer sağ lobu MPO aktivitesi ölçmek için kullanıldı. Akciğer dokusunda MPO aktivitesi Koike K. ve ark.'nın tanımladığı metotla ölçüldü⁹.

İstatistiksel Analiz

Ölçümler median ve range olarak bildirildi. Gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis tek

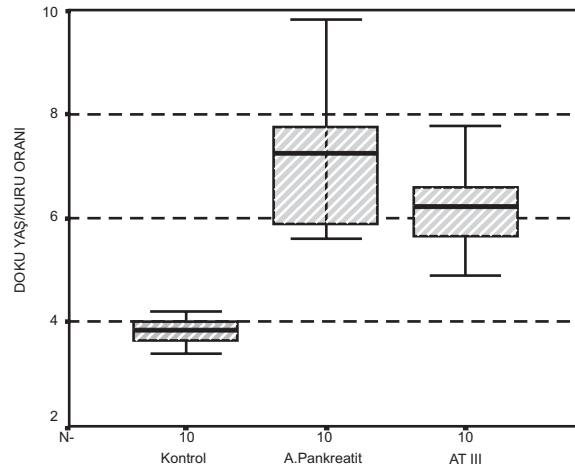
yönlü varyans analizi testiyle karşılaştırıldı. İkili gruplar arası kıyaslamalar Mann-Whitney U testi ile yapıldı. p<0,05 olduğunda sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm analizler SPSS 10.0 sürümüyle yapıldı.

BULGULAR

Akciğer dokusu yaş/kuru ağırlık oranı

Gruplar arasında akciğer dokusu yaş/kuru oranı değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($X^2=20,63$, 2d.f. p<0.0001). AP geliştirilen grupla (Grup II) kontrol grubu kıyaslandığında, yaş/kuru ağırlık oranında istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı [7,24 (5,60-9,80), 3,86 (3,54-4,45), p<0,0001]. Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında Grup III de ödemde azalma saptanmasına rağmen [6,22 (4,90-7,78)] istatistiksel olarak grup II den farklılık yoktu (p=0,096) (Şekil I).

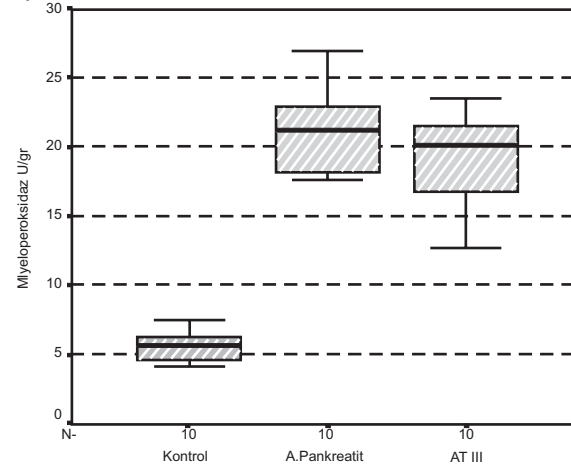
Şekil I



Akciğer dokusu MPO analizi

Her üç grup arasında MPO seviyeleri arasında istatistiksel farklılık bulundu ($X^2=20,78$ 2d.f. p<0,0001). Grup I ve Grup II kıyaslandığında [5,19 U/gr (4,17-7,50), 21,17 U/gr (17,66-26,89)] Grup II de

Şekil II



anlamli istatistiksel artiş vardı (P<0.0001). Grup III'de (tedavi grubu) doku MPO aktivitesinde azalma vardı [18,11 U/gr (12,67-23,54)]. Fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,076) (Şekil II).

TARTIŞMA

Çalışmamızda pankreatit grubunda lökosit aktivasyonunun göstergesi olan akciğer dokusu MPO aktivitesi ve kapiller kaçığı gösteren yaş/kuru ağırlık oranındaki artiş pankreatit grubunda anlamlı derecede yüksekti. Bu bulgular modelimizde pankreatite bağı akciğer hasarının geliştiğini göstermektedir. Pankreatite bağı multi organ yetmezliğinin etiolojisinde tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-a), interlökin-1, interlökin-6, platelet aktive edici faktör (PAF) ve nitrik oksit gibi proinflamatuvar mediatörler önemli rol oynamaktadır¹⁰. Başlangıçta hasar gören pankreas asinar hücrelerinden salınan sitokinler ve kemokinler, olayın ilerlemesiyle peritoneal inflamatuvar hücrelerden salgılanırlar¹¹⁻¹³. Üretilen bu maddelerle aktive olan dolaşımdaki inflamatuvar hücreler ve özellikle aktive nötrofiller pankreatitle ilişkili akciğer hasarında önemli rol oynamaktadır¹⁴⁻¹⁶.

Çalışmamızda grup II de akciğer dokusu MPO aktivitesindeki artiş akciğer dokusundaki nötrofil aktivasyonun indirekt bir göstergesidir⁸. Deneysel sepsis modelinde aktive olan lökositlerin endotel ile etkileşime girerek endotele yapıştıkları ve migrasyonla hedef organda biriktikleri gösterilmiştir¹⁷. Lökosit-endotel etkileşiminde trombin önemli rol almaktadır. Trombinin lökosit-endotel adezyonuna olan etkisi P-Selektin, E-Selektin, ICAM-1 ve endotelial platelet aktive edici faktör üretimini arttırarak olmaktadır^{18, 19}. Trombin'in en güçlü inhibitörü olan AT'nin iskemi-reperfüzyona bağı uzak organ hasarını ve sepsis modellerindeki akciğer hasarını engelleyici etkisi çalışmamızda sınırlı kalmıştır⁵⁻⁷. Bu durum nötrofil aktivasyonunda pankreasa özel bazı faktörlerin de olabileceğini düşündürmektedir.

Son dönemlerde pankreatik enzimlerinin de uzak organ hasarı oluşumunda önemli etkileri olduğu anlaşılmıştır¹⁰. Pankreatik enzimlerin uzak organlara nasıl ulaştığı net olarak belirlenememesine rağmen, bu yayılımda peripankreatik ve retroperitoneal lenfatik drenajın önemli rol oynadığı bildirilmektedir. Bu yayılma pankreasın portal ve sistemik dolaşımının da etkisi olmaktadır. Deneysel olarak pankreas enzimlerinin intraperitoneal olarak verilmesiyle ARDS benzeri bir tablo oluşturulmuştur. Bu tabloyu pankreatik elastaz lökositleri aktive ederek ve sitokin üretimini arttırarak yapmaktadır²⁰.

Literatürde akciğer ödeminin derecesini değerlendirmek amacıyla çeşitli metotlar kullanılmıştır²¹⁻²⁴. Çalışmamızda akciğer vasküler yatağında mikrovasküler permeabilite değişikliklerini değerlendirmek amacıyla akciğer dokusu yaş/kuru

ağırlığı oranı kullanıldı. Göreceli olarak basit bir metot olan akciğer dokusu yaş/kuru ağırlık oranı dolaylı olarak bu organda toplanan sıvı miktarını gösterir. Yaş/kuru ağırlık oranıyla gösterilen akciğer ödemi AP sonrası istatistiksel olarak anlamlı artiş göstermiş ve bu artiş grup III'de AT kullanımını sonrası kısmen azalmıştır.

Kruse ve ark. deneysel akut pankreatit modelinde AT düzeylerinin erken dönemde azaldığını bildirmişlerdir²⁵. Bir başka çalışmada ise insanlarda akut pankreatitin erken döneminde AT ve a₂-makroglobulin düzeylerinde azalma saptanmıştır²⁶. Warren ark. prospektif randomize bir klinik çalışmada, AT'nin sepsisli hastalarda mortaliteyi azalttığını göstermiştir²⁷.

Literatürde deneysel iskemi-reperfüzyon ve sepsis modellerinde gelişen akciğer hasarı üzerine olumlu etkileri bildirilen AT'nin çalışmamızda oluşturulan pankreatite bağı akciğer hasarını kısmen azalttığı, fakat bu etkinin iskemi-reperfüzyon ve sepsis modellerine göre çok daha sınırlı kaldığı görülmektedir. Bu da pankreatite bağı akciğer hasarının oluşum mekanizmasında sepsis ya da iskemi-reperfüzyon modellerinden farklı başka faktörlerin de varlığını düşündürmektedir. Bu konuda altta yatan mekanizmaları aydınlatmak için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Steer ML. Etiology and pathophysiology of acute pancreatitis. In: Go VLV, Dimango EP, Gardner JD, Lebenthal E, Rober HA, Scheele GA (eds). The pancreas:biology, pathobiology, and disease. New York Raven, 1993: 581-92.
2. Renner I, Savage W, Pantoja J, et al. Death due to acute pancreatitis: a retrospective analysis of 405 autopsy cases. Dig Dis Sci 1985; 30: 1005-18.
3. Lankrisch PG, Burchard-Reckert S, Petersen M, et al.. Morbidity and mortality in 602 patients with acute pancreatitis seen between the years 1980-1994. Z Gastroenterol 1996; 34: 371-7.
4. Ostrovsky L, Woodman RC, Payne D. Antithrombin III prevents and rapidly reverses leukocyte recruitment in ischemia/reperfusion. Circulation 1997; 96: 2302-10.
5. Harada N, Okajima K, Kushimoto S, et al. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion injury of rat liver by increasing the hepatic level of prostacyclin. Blood Coagul Fibrinol 1999; 93: 157-64.
6. Özden A, Sarioglu A, Demirkan NÇ, et al. Antithrombin reduces renal ischemia-reperfusion injury in rats. Res Exp Med (Berl) 2001; 200: 195-203.
7. Özden A, Tetik C, Bilgihan A. Antithrombin III prevents 60 min warm intestinal ischemia reperfusion injury in rats. Res Exp Med (Berl) 1999; 198: 237-46.
8. Woodman RC, Ostrovsky L, Teoh D. Antithrombin and ischemia/reperfusion. Blood Coagul Fibrinol 1998; 9: 7-15.
9. Koike K, Moore E, Moore F, et al. Gut ischemia/reperfusion produces lung injury independent of endotoxin. Crit Care Med 1994; 22: 1438-44.

10. Zyromski N, Murr MM. Evolving concepts in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Surgery* 2003; 133: 235-7.
11. Kusske AM, Rongione AJ, Reber HA. Cytokines and acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1996; 110: 639-42.
12. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, et al. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest* 1997; 100: 1853-62.
13. Mikami Y, Takeda KT, Shibuya K, et al. Peritoneal inflammatory cells in acute pancreatitis: Relationship of infiltration dynamics and cytokine production with severity of illness. *Surgery* 2002; 132: 86-92.
14. Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, et al. The role of intercellular adhesion molecule-1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 1999; 116: 694-701.
15. Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004; 202: 145-56.
16. Pastor CM, Matthay MA, Frossard JL. Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights. *Chest* 2003; 124: 2341-51.
17. McMillen MA, Huribal M, Sumpio B. Common pathway of endothelial-leukocyte interaction in shock, ischemia, and reperfusion. *Am J Surg* 1993; 166: 557-62.
18. Serafini FM, Rosemurgy AS. Adhesion molecules: Clinical implications. *Surgery* 2000; 127: 481-3.
19. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Trombin stimulate the adherence of neutrophils to human endothelial cell in vitro. *J Clin Invest* 1985; 76: 2235-46.
20. Jaffray C, Yang J, Carter G, et al. Pancreatic elastase activates pulmonary nuclear factor kappa B and inhibitory kappa B, mimicking pancreatitis-associated adult respiratory distress syndrome. *Surgery* 2000; 128: 225-31.
21. Schmelling DJ, Caty MG, Oldham KT, et al. Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery* 1989; 106: 195-7.
22. Dowdall JF, Winter DC, Bouchier-Hayes DJ. Inosine modulates gut barrier dysfunction and end organ damage in a model of ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2002; 108: 61-8.
23. Koike K, Yamamoto Y, Hori Y, et al. Group II phospholipase A2 mediates lung injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 2000; 232: 90-7.
24. Tavaf-Motamen H, Miner TJ, Starnes BW, et al. Nitric oxide mediates acute lung injury by lation of inflammation. *J Surg Res* 1998; 78: 137-43.
25. Kruse P, Hage E., Lasson A., Proteases and protease inhibitors in taurocholate-induced acute pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 1999; 25: 113-21.
26. Lasson A, Ohisson K. Consumptive coagulopathy, fibrinolysis and protease-antiprotease interactions during acute human pancreatitis. *Thromb Res* 1986; 41: 167-83.
27. Warren BL, Eid A, Singer P, et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 286: 1869-78.

YAZIŞMA ADRESİ

Dr. Faruk Önder AYTEKİN
PK 32 20100 DENİZLİ-TÜRKİYE

Telefon : 0 535 364 1448

Faks : 0 258 213 4922

E-Posta : *aytekinfaruk@yahoo.com*

Geliş Tarihi : 25.03.2004

Kabul Tarihi : 11.05.2004