

# Prehepatik Portal Hipertansiyonlu Ratlarda Propranolol ve Octreotide Tedavisinin Karaciğere ve Vasküler Endotel Üzerine Etkisi

## The Effects of Propranolol and Octreotide Treatments on Liver and Vascular Endothelium in Rats with Pre-Hepatic Portal Hypertension

Ahmet Var\*

Yeşim Güvenç\*

Ece Onur\*

Kemal Özbilgin\*\*

Gülşen Giray\*\*

Özer İlkül\*\*\*

Zeki Ar\*

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Manisa

\*Biyokimya AD, \*\*Histoloji ve Embriyoloji AD, \*\*\*Genel Cerrahi AD

### ÖZET

**Amaç:** Portal hipertansiyon (PHT), portal basıncın patolojik düzeylere yükseldiği, hemodinamik değişikliklerle karakterize, sık görülen bir klinik sendromdur. PHT patogenezinde oksidan stresin bir mediyatör olduğu bilinmektedir. Tedavisinde portal kan akımını azaltıcı etkisi bulunan  $\alpha$ -Blokörler (propranolol), somatostatin ve uzun etkili somatostatin analogları (octreotide) kullanılabilir. Çalışmamızda PHT tedavisinde kullanılabilen propranolol ve octreotide'in oksidan strese olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, karaciğerde myeloperoksidaz (MPO), malondialdehit (MDA), Nitrik Oksit (NO) ve histokimyasal olarak indüklenebilir NOS (i-NOS) ve endotelial NOS (e-NOS) düzeyleri araştırılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Ağırlıkları 200-240 g olan 58 adet erkek Wistar rat, rastgele seçilerek dört gruba ayrılmıştır. Cerrahi girişimler, IM ketamin anestezisi (50 mg/kg) altında gerçekleştirilmiştir. Gruplar; Sham (Grup I), PHT (Grup II), PHT + octreotide (Grup III), PHT + propranolol (Grup IV) şeklinde oluşturulmuştur.

Grup II, III ve IV'e sekiz hafta boyunca prehepatik portal hipertansiyon indüklenmesi yapılmıştır. Sekiz hafta sonra, bütün denekler servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek laparotomi yapılmıştır. Tüm gruplarda, dokuda MDA TBARS yöntemine göre, MPO Wei ve arkadaşlarının tanımladığı yöntemle spektrofotometrik olarak, NO Griess yöntemi ile, i-NOS ve e-NOS da histokimyasal yöntemler ile araştırılmıştır.

**Bulgular:** Grup II (PHT)'de MDA, MPO ve NO düzeyleri, grup I (sham)'e göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.05$ ). Octreotide uygulanan PHT'li grup III'te MPO düzeyleri, grup II (PHT) ve IV (PHT+propranolol)'e göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). Propranolol uygulanan grup IV'te NO düzeyleri, diğer portal hipertansiyon grupları olan II ve III'den anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

Grup I'de karaciğer endotelial hücrelerde zayıf e-NOS immunoreaktivitesi gözlenirken, aynı aktivite parankimal hücrelerde gözlenmemiştir, ancak PHT + propranolol uygulanan grup IV'te e-NOS immuno-

reaktivitesi parankimal hücrelerden daha fazla bulunmuştur. Grup I (Sham)'de i-NOS immunoreaktivitesine her iki hücre grubunda da rastlanmamıştır. Grup II'de parankimal hücrelerde ve perivasküler alanda i-NOS immunoreaktivitesinde artış saptanmıştır. Grup III'de i-NOS immunoreaktivitesi ılımlı, grup IV'te ise yüksek derecede artmış olarak bulunmuştur.

**Sonuç:** PHT tedavisinde kullanılan iki farklı preparattan octreotide'in nötrofil aktivasyonunu artırarak MPO etkisi aracılığı ile, propranolol'ün ise NO üzerinden, PHT'da oksidan stresi artırarak etkili olduğu görülmüştür. Propranolol verilmesi histokimyasal açıdan i-NOS düzeylerinde e-NOS'a göre daha belirgin artışa neden olmuştur. i-NOS düzeyleri ile birlikte NO düzeylerinde de artışın saptanması, propranolol uygulanmasının sitotoksik etkili endotelial disfonksiyona yol açabileceğinin histokimyasal ve biyokimyasal olarak kanıtı olarak kabul edilebilir. Sonuç olarak; istenmeyen yan etkilerinden dolayı bu iki preparatın portal hipertansiyon tedavisinde dikkatli kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Portal hipertansiyon, serbest radikaller, endotelial disfonksiyon, octreotide, propranolol

### ABSTRACT

**Purpose:** Portal hypertension (PHT) is a common clinical syndrome, characterized by a pathological increase in portal pressure and hemodynamic changes. It is known that the oxidative stress is a mediator in the pathogenesis of PHT. Beta-blockers (propranolol), somatostatin and analogs of long-acting somatostatin (octreotide) that all have an effect on the portal blood flow may be used for treatment. In this study it was aimed to investigate the effects of propranolol and octreotide that may be used for treatment of PHT to oxidative stress. For this purpose, myeloperoxidase (MPO), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) levels, and the inducible NOS (i-NOS), endothelial NOS (e-NOS) were evaluated by histochemical techniques.

**Material and Methods:** 58 male wistar rats weighed 200 to 240 gr were randomly selected and separated into four groups. Surgical operations were performed after an anesthesia with ketamine (50 mg/kg, IM) Groups were structured as: Sham (Group I), PHT (Group II), PHT + octreotide (Group III), PHT + propranolol (Group IV).

Induction of prehepatic portal hypertension was performed to Group II, III and IV for eight weeks. All rats were sacrificed by cervical dislocation and laparotomy was performed. MDA in tissue by TBARS method, MPO by the method explained by Wei et al spectrophotometrically, NO by Griess method, i-NOS and e-NOS by histochemical methods were evaluated in all groups.

**Results:** MDA, MPO and NO levels were significantly higher in group II (PHT) than Group I (Sham) ( $p=0.001$ ,  $p=0.05$ ,  $p=0.05$ , respectively). The MPO levels in group III (PHT and octreotide) were significantly higher than Group II (PHT) and Group IV (PHT+propranolol) ( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ , respectively). NO levels in group IV were significantly higher than in both Group II and III with portal hypertension ( $p<0.05$ ). Mild e-NOS immunoreactivity was observed in hepatic endothelial cells in Group I, no similar activity was observed in parenchymal cells. However, in Group IV (PHT + propranolol) e-NOS immunoreactivity was higher than parenchymal cells. No i-NOS immunoreactivity was observed in two kinds of tissue in Group I (Sham). An increase of i-NOS immunoreactivity in parenchymal cells and perivascular area was detected in Group II. It was observed that i-NOS immunoreactivity increased mildly in Group III and highly in Group IV.

**Conclusions:** It was seen that octreotide, one of the two different medicine used in the treatment of PHT, increased neutrophil activation via the effect of MPA and propranolol increased oxidative stress in PHT via NO. Applying propranolol increased levels of i-NOS more than e-NOS histochemically. Therefore these two drugs should be used cautiously in the treatment of portal hypertension due to these adverse-effects.

**Key Words:** Portal hypertension, free radicals, endothelial dysfunction, octreotide, propranolol

### GİRİŞ

Portal hipertansiyon (PHT), portal basıncın patolojik düzeye yükseldiği, hemodinamik değişikliklerle karakterize, sık görülen bir klinik sendromdur. Prehepatik, hepatik ve/

veya posthepatik olabilen obstrüksiyon, portal akış hızını azaltarak vasküler direncin artmasına yol açar (1). PHT'lu hastalarda artmış kardiyak output ve kalp hızı, azalmış arteriel kan basıncı ve sistemik vasküler rezistans

ile karakterize hiperdinamik bir sistemik sirkülasyon mevcuttur. PHT ve ayrıca bu zeminde gelişebilen siroz, portal hipertansif gastropati ve özefagus varislerine yol açarak yüksek mortaliteye neden olabilmektedir. PHT'da lipid peroksidasyonunun arttığı ve bu hastalığın patogenezinde serbest radikallerin önemli rolü olduğu, ayrıca endotelial disfonksiyonda oksidatif stresin bir mediatör olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda octreotide (2,3) ve propranolol'un (4,5) portal basıncı azaltıcı etkisi olduğu bildirilmiş ve bu nedenle de PHT tedavisinde non-selektif bloker, somatostatin ve somatostatin'in uzun etkili analogu olan octreotide uygulanmaya başlanmıştır (6,7).

Yapılan kaynak taramalarında; PHT tedavisinde kullanılabilen octreotide ve propranolol'un karaciğerde oksidan stres üzerine olan etkilerinin yeterli düzeyde araştırılmadığı dikkati çekmiştir.

Bu çalışmada, octreotide ve propranolol gibi iki preparatın karaciğerde oksidan stres üzerine olan ve ayrıca histokimyasal olarak vasküler endotel ve parankimal hücreler üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu nedenle karaciğer dokusunda histokimyasal incelemenin dışında nötrofil infiltrasyon göstergesi olarak MPO, lipid peroksidasyon göstergesi olarak MDA ve ayrıca serbest radikal olarak da NO düzeyleri biyokimyasal yöntemler ile incelenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Denekler

Ağırlıkları 200-240 g olan 58 adet erkek Wistar rat, rastgele seçilerek dört gruba ayrıldı. Cerrahi girişimler, IM ketamin anestezisi (50 mg/kg) altında gerçekleştirildi.

### Deney protokolu

Grup I: Sadece laparotomi uygulanmış olan sham grubu (n=12),

Grup II: 10 gün boyunca portal ven ligasyonu uygulanan PHT grubu (n=12),

Grup III: PHT + octreotide (subkutanöz 1 µg/kg/g 14 gün) (n=17),

Grup IV: PHT + propranolol (intraperitoneal 2,5 mg/kg/g 14 gün) (n=17).

Grup II, III ve IV'e sekiz hafta boyunca pre-hepatik portal hipertansiyon indüklenmesi yapıldı. Bütün denekler sekiz haftalık süre boyunca standart yem ve su ile beslenerek 12 saat sürekli aydınlık, 12 saat sürekli karanlık ortamda tutuldular. Parsiyel portal ven ligasyonu için ketamin anestezisi sonrası standart orta hat insizyonu yapıldı. Portal ven, proksimalden bifurkasyona kadar eksplore edildi. Portal stenoz oluşturmak için portal ven, 20 numara branül ile birlikte 4.0 ipek ile 10 gün süre ile bağlandı (8,9). Bu yöntemle portal vende yaklaşık %75 'lik darlık elde edildikten sonra branül geri çekildi. Orta hat insizyonu 3.0 ipek ile kapatıldı. Sekiz hafta sonra, bütün denekler bir gece açlık sonrası servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek laparotomi yapıldı. Karaciğer dokusu hızlı olarak çıkarıldı ve soğuk serum fizyolojik (SF) ile yıkandı, cam tüplere konarak homojenize edilinceye kadar derin dondurucuda (-80 °C) saklandı.

### Doku homojenat eldesi

Karaciğer dokusu buz üzerinde 12.000 rpm'de 2 dakika süre ile homojenizatör ile (IKA T25 basic U.K) homojenize edildi. NO tayini için soğuk Tris-HCL tampon (0.1 M, pH= 7.5), MDA ölçümü için %1.15 KCl, MPO enzim aktivitesi için ise 50 mM potasyum fosfat tampon içinde (pH=6) %0.5 hexadecyl-trimethylammonium bromide içeren solüsyon kullanıldı. Homojenizasyon sonrasında örnekler artıklarından arındırılmak üzere 3000 rpm'de +4 °C'de santrifüj edildi. Tüm ölçümler +4 °C'de saklanan süpernatantlarda 24 saat içinde gerçekleştirildi.

### Biyokimyasal analizler

#### Malondialdehit (MDA)

Doku MDA tayini, Ohkawa'nın (10) geliştirdiği TBARS (thiobarbituric reaktif substances) yöntemine göre spektrofotometrik (Shimadzu UV-1201V, Japan) olarak gerçekleştirildi. MDA düzeyleri nmol / g doku proteini olarak ifade edildi.

### **Myeloperoksidaz (MPO)**

Myeloperoksidaz enzim aktivitesi tayini Wei ve arkadaşlarının (11) tanımladığı, substrat olarak 25 mM 4-aminoantipirin % 2 fenol solüsyonunun kullanıldığı, 1,7 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in MPO aracılı oksidasyonu prensibine dayanan spektrofotometrik metod ile tayin edildi. Dokular homojenize edildikten sonra 4-aminoantipirin-fenol ve %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonları ile muamele edildi, oluşan absorbans farkı 5 dakika ara ile 510 nm'de spektrofotometrik olarak kaydedildi. MPO enzim aktivitesinin 1 ünitesi; 25 °C'de 1 dakikada 1 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi yıkan enzim miktarıdır. Sonuçlar homojenatın protein değeri ölçülerek U/g protein olarak belirlendi.

### **Nitrik oksid (NO)**

Nitrik Oksid üretiminin göstergesi olarak, stabil nitrik oksid metabolitleri olan Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ölçümü Griess reaksiyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak yapıldı (12). Homojenize edilen karaciğer dokuları, nitrik oksid ölçümünde oluşabilecek interferansları elimine etmek için Somogy reaktifi (13) ile deproteinize edilip, taze hazırlanmış reaktifle karıştırıldı. 40 dakika inkübasyon sonrasında absorbans spektrofotometrik olarak ölçülerek nitrit tayini yapıldı. Deproteinize edilen örneğin kalan miktarı, nitratın nitrite indirgenmesi için, pH=9,7 glisin tamponunda bakır kaplanmış kadmiyum granülleri ile 90 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası Griess reaksiyonu ile tekrar nitrit tayini yapıldı. Yapılan son nitrit ölçümü (nitrit+nitrat) total NO'nin göstergesi olarak kaydedildi. Standart eğrisi sodyum nitrit'in 50 µmol/L den 5 µmol/L'ye kadar bir seri dilüsyonu ile oluşturuldu. Sonuçlar homojenatın protein değerine bölünerek µmol/g protein olarak verildi.

### **Doku Protein**

Homojenatlardaki protein düzeyleri, Lowry yöntemi ile belirlendi (14).

### **İmmunohistokimya**

Histokimyasal ve immunohistokimyasal boyama için, çıkarılan karaciğer dokuları para-

formaldehit içine konuldu. Örnekler su ile yıkandı ve %60, 70, 80, 90 100'lük etanol içerisinde tutuldu. Daha sonra örnekler 90 dakika boyunca xylene solüsyonunda ve bunu takiben 60°C parafin içinde bekletildi. Örneklerden 5 µm incelikte kesitler alınarak histokimyasal ve immunohistokimyasal boyamalar için hazırlık yapıldı.

### **e-NOS, i-NOS**

Histolojik tanı için Hemotoxylin-Eosin (HE) boyası kullanıldı. İmmunohistokimyasal boyama için; kesitler 60°C'de bir gece bekletildikten sonra xylene içinde 30 dakika inkübe edildi ve etanol ile yıkandı. 37°C'de 15 dakika %2 trypsin-tris tampon'da bekletildikten sonra fosfat tamponu ile (PBS) ile 3 kez yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 15 dakika boyunca %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonunda bekletildi. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra, +4°C'de bir gece boyunca primer antikolar olan anti i-NOS (Zymed 61-770) ve anti e-NOS ile birlikte inkübe edildi. Biotinize IgG ve streptavidin-peroxidase konjugat ile inkübasyondan sonra PBS ile yıkandı. Bunu takiben immunoreaktiviteyi belirlemek için kesitler diaminobenzidin ve Mayer hemotoxylin ile 5 dakika boyunca inkübe edildi. Kesitler lamelle kapatılarak BX 40 ışık mikroskopu ile incelendi. Kontrol örneklere aynı işlemler uygulanarak, boyanma yoğunluğuna göre hafif (+), ılımlı (++) ve kuvvetli (+++) olarak derecelendirildi.

### **İstatistiksel analiz**

Tüm nominal değerler için karşılaştırmalarda gruplar arasındaki farklılığı göstermek için nonparametrik testler (Kruskal-Wallis, Mann Whitney-U testi) uygulandı, p< 0.05 olan değerler, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verildi.

### **BULGULAR**

#### **Biyokimyasal parametreler**

Tüm gruplardaki MDA, MPO ve NO düzeyleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Portal hipertansiyon oluşturulmuş olan Gru p II'de MDA, MPO ve

**Tablo 1.** Grup I (sham), grup II (portal hipertansiyon), grup III (portal hipertansiyon + octreotide) ve grup IV'te (portal hipertansiyon + propranolol) NO, MPO ve MDA düzeyleri (ortalama  $\pm$  SD).

	Grup I (sham) (n=12)	Grup II (PHT) (n=12)	Grup III (PHT+oct) (n=17)	Grup IV (PHT+prop) (n=17)
MDA (nmol/gprot)	8,14 $\pm$ 2,28 <sup>a</sup>	22,08 $\pm$ 7,55	22,71 $\pm$ 3,75	21,29 $\pm$ 4,15
MPO (mU/gprot)	46,2 $\pm$ 30,2 <sup>bcd</sup>	95,5 $\pm$ 52,6	160,6 $\pm$ 53,2 <sup>ef</sup>	123,1 $\pm$ 24,4
NO ( $\mu$ mol/gprot)	1,14 $\pm$ 0,27 <sup>bgc</sup>	1,64 $\pm$ 0,63	1,75 $\pm$ 0,57	2,72 $\pm$ 1,32 <sup>h</sup>
<sup>a</sup> p<0.001 grup I-II,III,IV		<sup>b</sup> p<0.05 grup I-II	<sup>c</sup> p<0.001 grup I-IV	<sup>d</sup> p<0.001 grup I-III
<sup>e</sup> p<0.01 grup III-II		<sup>f</sup> p<0.05 grup III-IV	<sup>g</sup> p<0.01 grup I-III	<sup>h</sup> p<0.05 grup IV-II,III

NO düzeyleri sham grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla p<0.001, p<0.05, p<0.05). Grup II, III ve IV arasında MDA düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Octreotide uygulanan PHT'lu grup III'te MPO düzeyleri, grup II (PHT) ve IV (PHT+propranolol)'e göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (sırasıyla p<0.01, p<0.05). Propranolol uygulanan grup IV'te NO düzeyleri, diğer portal hipertansiyon grupları olan II ve III'den anlamlı yüksek bulunmuştur (p<0.05).

### İmmunohistokimyasal bulgular

Tablo 2'de e-NOS ve Tablo 3'de i-NOS'un histokimyasal boyanma özellikleri belirtilmiştir.

#### Grup I

Tüm kesitlerde hepatositler geniş polihedral şekilde görülmektedir ve yuvarlak nükleusları vardır. Endotel hücrelerinde zayıf e-NOS immunoreaktivitesi görülmüşken parankimal hücrelerde gözlenmemiştir. İndüklenebilir NOS aktivitesi hiçbir alanda saptanmamıştır.

#### Grup II

Portal hipertansiyon grubunda yapısal durum grup I'e benzemektedir fakat sentrilobüler venüller ve safra kanalları genişlemiştir. Damar kalınlığı artmış ve lenfositik infiltrasyon damarlar çevresinde izlenmektedir. Hepatik hücreler grup II'de belirgin şekilde şişmiştir. Grup II'de parankim hücreleri ve endotelial hücrelerde e-NOS immunoreaktivitesi grup I'e benzerdir. Fakat her iki grup-

**Tablo 2.** Grup I, II, III ve IV'te e-NOS immunoreaktivitesi.

	Karaciğer endoteli	Karaciğer parankimi
Grup I e-NOS	+	-
Grup II e-NOS	+	+
Grup III e-NOS	+	+
Grup IV e-NOS	++	+

**Tablo 3.** Grup I, II, III ve IV'te i-NOS immunoreaktivitesi.

	Perivasküler alan	Karaciğer parankimi
Grup I i-NOS	-	-
Grup II i-NOS	+	+
Grup III i-NOS	++	++
Grup IV i-NOS	+++	+++

ta perivasküler alan ve parankimal hücrelerde i-NOS immunoreaktivitesi artmıştır.

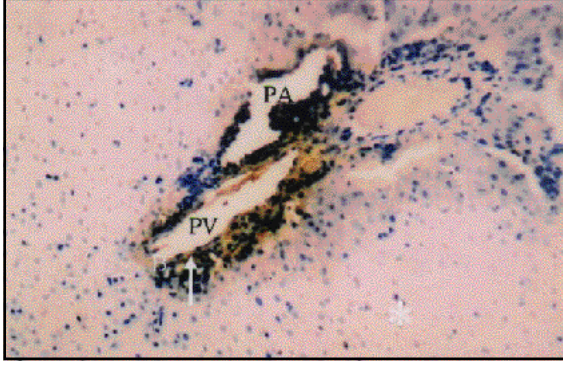
#### Grup III

Octreotide + PHT grubunda sentrilobüler venüllerde ve safra kanallarında genişleme görülmemiştir. Parankimal hücre ödemi daha az belirgindir. Lenfositik infiltrasyon vardır, ancak yoğunluğu grup II'den azdır. Endotelial hücreler ve parankimal hücrelerde e-NOS immunoreaktivitesi zayıf (+) olmakla birlikte (Şekil 1), perivasküler alan ve parankimal hücrelerdeki i-NOS MoAb immunoreaktivitesi ılımlı (++) derecede izlenmiştir (Şekil 2).

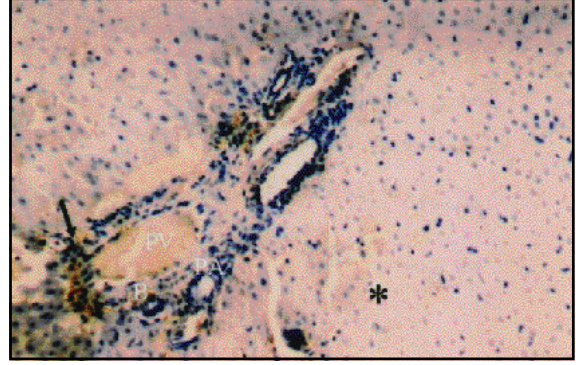
#### Grup IV

Sentrilobüler venüller ve safra kanallarında genişleme görülmüştür. Parankim hücre ödemi ve lenfositik infiltrasyon belirgindir. Endotelial

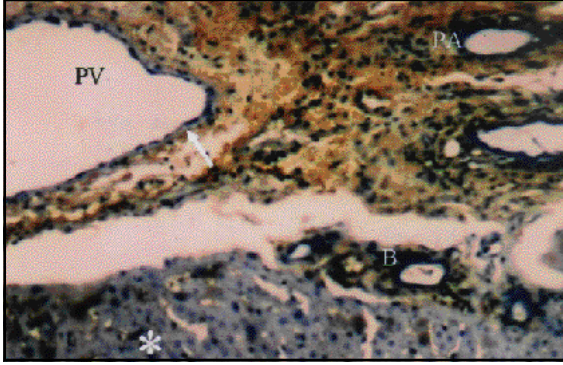
Var A. ve ark.



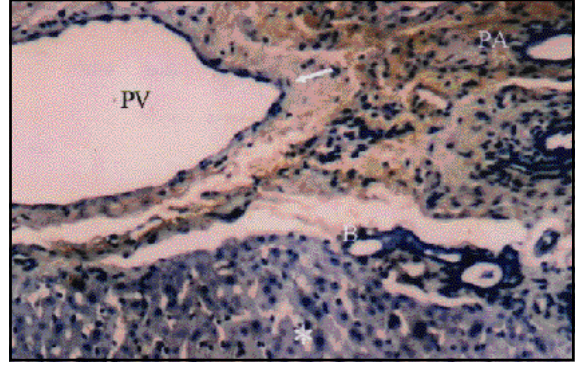
**Şekil 1.** PHT ve octreotide verilen grubun karaciğer örneklerinin e-NOS MoAb ile boyama sonrası mikroskoptan çekilen fotoğrafı. Endotel hücrelerinde ve parankim hücrelerinde zayıf immunoreaktivite gözlenmiştir. Portal venül (PV), portal arteriöl (PA) ve safra kanalı (B) (H.E X200)



**Şekil 2.** PHT ve octreotide verilen grubun karaciğer örneklerinin i-NOS MoAb ile boyama sonrası mikroskoptan çekilen fotoğrafı. Perivasküler alanda ve parankim hücrelerinde ılımlı immunoreaktivite gözlenmiştir. Portal venül (PV), portal arteriöl (PA) ve safra kanalı (B) (H.E X200)



**Şekil 3.** PHT ve propranolol uygulanan grubun karaciğer örneklerinin e-NOS MoAb ile boyama sonrası mikroskoptan çekilen fotoğrafı. Endotel hücrelerinde ılımlı, parankim hücrelerinde ise zayıf immunoreaktivite gözlenmiştir. Portal venül (PV), portal arteriöl (PA) ve safra kanalı (B) (H.E X200)



**Şekil 4.** PHT ve propranolol uygulanan grubun karaciğer örneklerinin i-NOS MoAb ile boyama sonrası mikroskoptan çekilen fotoğrafı. Perivasküler alanda ve parankim hücrelerinde güçlü immunoreaktivite gözlenmiştir. Portal venül (PV), portal arteriöl (PA) ve safra kanalı (B) (H.E X200)

hücrelerde e-NOS immunoreaktivitesi ılımlı (++) olmasına rağmen, parankimal hücrelerde zayıftı (+) (Şekil 3). Perivasküler alanda ve parankimal hücrelerde i-NOS immunoreaktivitesi çok güçlü izlenmiştir (+++) (Şekil 4).

## TARTIŞMA

PHT'da lipid peroksidasyonunun arttığı ve bu hastalığın patofizyolojisinde serbest radikallerin önemli rol oynadığı, oksidatif stresin endotelial fonksiyonun bir medyatörü olduğu daha önce yapılmış olan çalışmalarda gösterilmiştir. PHT'da meydana gelen

parsiyel iskemi sırasında, süperoksid anyonu ( $O_2^-$ ) gibi serbest oksijen radikalleri üretilmektedir. NO ve serbest oksijen radikalleri birbirleriyle etkileşerek peroksinitrit radikali ( $ONOO^-$ ) üretir (15). Yaptığımız çalışmada, propranololün karaciğer doku ve endotelinde NO düzeylerini arttırdığı ve artmış NO düzeylerinin de portal sirkülasyonda vazodilatasyona yol açtığı gösterilmiştir. Peroksinitrit radikali, süperoksid anyonu ve amonyak gibi bazı maddelerin birikimi, PHT'da endotelial disfonksiyonun gelişmesine yol açmaktadır. Propranolol'ün portal



basıncı düşürücü etkisi, artmış olan NO düzeyleri ile ilişkili olabilir. Çalışmamızda octreotide'in NO üretimine etkisi olmadığı gözlenmiştir.

Diğer taraftan özellikle gastrointestinal traktustan olan bakteriyel translokasyon, kronik portal hipertansiyonda septik komplikasyonların patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Schimpl ve ark. (15,16) ile Chiva ve ark. (17) portal hipertansif ratlarda MPO düzeylerinde artış olduğunu gözlemişler ve portal hipertansiyonun gastrointestinal traktusta bakteriyel translokasyonu kolaylaştırdığını ileri sürmüşlerdir. MPO, polimorfonükleer nötrofillerin antimikrobiyal sisteminin bir komponentidir ve hidrojen peroksit ile klorid'in hipokloröz aside dönüşümünü katalizler. Hipokloröz asid, nötrofiller tarafından üretilen en güçlü oksidan maddedir ve iskemi-reperfüzyon hasarı gibi inflamatuvar doku yaralanmasına yol açmaktadır (18). İskemik veya hasarlı endotelden salınan kemotaktik maddeler, nötrofil yapışmasına, aktivasyonuna ve MPO aktivitesi ile korele olan inflamatuvar yanıtı yol açan daha ileri bir hasara sebep olmaktadır (19). Aktive olmuş nötrofiller ve serbest oksijen radikalleri, hidrojen peroksit ile hipokloröz asidi sekrete eder ve üretirler. Oluşan toksik oksijen ürünleri, doku üzerinde son derece yıkıcı etkiye sahiptir (20). Nötrofil migrasyonu, çeşitli kemotaktik faktörlerle, IL-1, TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ , kompleman faktörlerini içeren sitokinlerle ve IL-8, GRO- $\alpha$  (growth-related onkogene), PF4 (trombosit faktör 4), MCP-1 (monosit kemotaktik protein), IP-10 (indüklenbilir protein 10), MIG (interferon gama ve bakteriyel polisakkaridler tarafından indüklenen monokin) gibi kemokinlerle stimüle olmaktadır. Nötrofiller, endotel hücre yüzeyinde nötrofil reseptörü olarak fonksiyon gören selektinler aracılığı ile endotele yapışmaktadır. Nötrofil hücre yüzeyinde integrin reseptörleri ekstrasellüler matrikse bağlanmayı kolaylaştırır. Nötrofillere uzun süre gereksinim duyulmadığında, doku makrofajları tarafından ortadan kaldırılırlar.

PHT'da karaciğer dokusunda nötrofil infiltrasyonu artar ve bu hücreler toksik oksijen ürünleri sekrete ederek doku hasarını şiddetlendirebilir. Çalışmamızda octreotide verilmesinin, bu istenmeyen yan etkileri arttırabileceği düşünülmüştür.

Somatostatin ve octreotide'in varis kanamasını durdurucu hemostatik mekanizması, hem portal kan akımını azaltıcı hem de kollateral vazokonstrüktif etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Huang ve ark. (21), octreotide'in direkt vazokonstrüktif etkiye sahip olmadığını, fakat endotelin-1 varlığında portal hipertansif ratlarda portal-sistemik kollaterallerde lokal vazokonstrüktif etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Son zamanlarda somatostatin sentetik analogları, meme, pankreas ve gastrointestinal traktus kanserlerinde başarı ile uygulanmaktadır (22). Alataş E. ve ark (23,24), octreotide'in uterus ve peritoneal dokudan MPO salınımını inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada, octreotide tedavisi uygulanan portal hipertansiyonlu ratlarda, inflamatuvar reaksiyona yanıt olarak MPO aktivitesi azalmış bulunmuştur. Yapılan kaynak taramasında, octreotide uygulamasının, sirotik karaciğerde nötrofiller tarafından MPO salınımını azalttığına dair herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Daha önceki çalışmalar, makrofajlar üzerine octreotide'in inhibitör etkisi olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda, octreotide uygulanan grupta MPO ve i-NOS düzeylerinde artış saptanmıştır. Bu artış, portal hipertansiyonda kemotaktik proteinler ve nötrofiller üzerine octreotide'in stimülatör etkisine bağlı olabilir. Bu etki doza bağımlı olabilir. Octreotide'in TNF- $\alpha$  gibi sitotoksinler ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi peroksidazlar üzerine olan doza bağımlı etkisi zaten bilinmektedir (21).

Portal hipertansiyonda artmış olan lipid peroksidasyonu (MDA), NO ve lökosit infiltrasyon göstergelerinden MPO düzeyleri, karaciğerde oksidan stres varlığını göstermektedir. Artmış toksik oksijen ürünleri doku hasarı gelişimi üzerine iki mekanizma ile etki yapabilir. Bunlardan birincisi, endotel veya parankim hücreleri ve membranları üzerine direkt

etki, ikincisi ise NO'nin peroksinitrite yıkılmasıyla karaciğer yatağında iskemi oluşumudur. Portal hipertansiyon tedavisinde kullanılan iki farklı preparattan octreotide'in nötrofil aktivasyonunu artırarak, MPO aracılığı ile, propranolol'ün ise NO üzerinden PHT'da oksidan stresi artırarak etkili olduğu görülmüştür. NO, hepatosit kaynaklı solunum zincirini baskılayarak ve DNA sentezini inhibe ederek hücre ölümüne yol açmaktadır. Propranolol verilmesi histokimyasal açıdan i-NOS düzeylerinde e-NOS'a göre daha belirgin artışa neden olmuştur. i-NOS düzeyleri ile birlikte NO düzeylerinde de artışın saptanması, propranolol uygulamasının sitotoksik etkili endotelial disfonksiyona yol açabileceğinin histokimyasal ve biyokimyasal olarak kanıtı olarak kabul edilebilir.

Sonuç olarak; istenmeyen yan etkilerinden dolayı bu iki preparatın portal hipertansiyon tedavisinde dikkatli kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Cahill PA, Redmond EM, Sitzmann JV. Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol Therap* 2001; 89: 273-293.
2. Gaudin C, Moreau R, Champigneulle B, Soubrane O, Kleber G, Labrec D. Short-term cardiovascular effects of somatostatin in patients with cirrhosis. *Liver* 1995; 15: 236-41.
3. Lin HC, Tsai YT, Yang MCM, Lee FY, Hou MC, Chen LS, Lee SD. Effect of octreotide on total effective vascular compliance in patients with posthepatic cirrhosis. *J Hepatol* 1996; 24: 81-7.
4. Andreu V, Perello A, Moitinho E, Escorsell A, Pagan JCG, Bosch J, Rodes J. Total effective vascular compliance in patients with cirrhosis. Effect of propranolol. *J Hepatol* 2002; 36: 356-361.
5. McCormick PA, Patch D, Greenslade L, Chin J, McIntyre N, Burroughs AK. Clinical haemodynamic response to drugs in portal hypertension. *J Hepatol* 1998; 28: 1015-1019.
6. Moller S, Brinch K, Henriksen HJ, Becker U. Effect of octreotide on systemic, central, and splanchnic haemodynamics in cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26: 1026-1035.
7. Banares R, Moitinho E, Matilla A, Pagan JCG, Lampreave JL, Perra C, Abraldes JG, Diego A, Albillos A, Bosch J. Randomized comparison of long-term carvedilol and propranolol administration in the treatment of portal hypertension in cirrhosis. *Hepatology* 2002; 36: 1367-1373.
8. Chojkier M, Groszmann RJ. Measurement of portal systemic shunting in the rat by using <sup>14</sup>C-labeled microspheres. *Am J Physiol* 1981; 240: 371-375.
9. Marshall J.O. Portal Hypertension and Portacaval Shunt. In "Surgical Research" (Wiley W Souba Ed.) pp.637-701 Academic Press 2001.
10. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
11. Wei H, Frenkel K. Relationship of oxidative events and DNA oxidation in Sencar mice to in vivo promoting activity of phorbol ester-type tumor promoters. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1195-1201.
12. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440-1443.
13. Somogy M. A method for the preparation of blood filtrates for the determination of sugar. *J Biol Chem* 1930; 86: 55 .
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
15. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, Feier G, Ratschek M, Hollwarth ME. Allopurinol and glutamine attenuate bacterial translocation in chronic portal hypertensive and common bile duct ligated growing rats. *Gut* 1996; 39: 48-53.
16. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, Feier G, Ratschek M, Hollwarth ME. Allopurinol reduces bacterial translocation, intestinal mucosal lipid peroxidation, and neutrophil-derived myeloperoxidase activity in chronic portal hypertensive and common bile duct-ligated growing rats. *Pediatr Res* 1996; 40: 422-8.
17. Chiva M, Guarner C, Peralta C, Llovet T, Gomez G, Soriano G, Balanzo J. Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 145-50.
18. Pabuccuoglu A, Konyalioglu S, Bas Meral, Mera GE. The in vitro effects of Hypericum species on human leukocyte myeloperoxidase activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 87: 89-92.
19. Demirpence E, Koksoy C, Kuzu A, Kılınç K. A spectrophotometric assay for tissue-associated myeloperoxidase activity and its application to intestinal ischemia-reperfusion. *Turk J Med Sci* 1997; 27: 197-200.
20. Uz E, Sogut S, Sahin S, Var A, Ozyurt H, Gulec M, Akyol O. The protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *World J Uro* 2002; 20: 264-270.



21. Huang HC, Lee FY, Chan CC, Chang FY, Wang SS, Lin HC, Hou MC, Chen CT, Tai CC, Lai IN, Lee SD. Effects of somatostatin and octreotide on portal-systemic collaterals in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 2002; 36: 163-168.
22. Chao TC, Chao HH, Lin JD, Chen MF. Somatostatin and octreotide modulate the function of kupffer cells in liver cirrhosis. *Regul Pept* 1999; 79: 117-124.
23. Alatas E, Alatas O, Colak O. Octreotide inhibits myeloperoxidase activity in rat uterus. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79: 524-7.
24. Alatas E, Gunal O, Alatas O, Colak O. Octreotide prevents postoperative adhesion formation by

suppressing peritoneal myeloperoxidase activity. *Hepatogastroenterology* 2000; 47(34): 1034-6.

---

**Yazışma adresi:**

Dr. Ahmet Var  
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı  
45020 Manisa  
Tel: +90 (236) 2393691  
Fax: +90 (236) 237 02 13  
e-mail: ahmet.var@bayar.edu.tr

---