

Sıçanlarda Asetik Asitle Oluşturulan DeneySEL Kolitte Sandostatinin Koruyucu Etkisi

Dr. Ahmet DOBRUCALI, Dr. Mehmet ALTIN, Dr. Murat TUNCER, Dr. Ersan SANDER, Dr. Süha GÖKSEL, Dr. Haluk SAVLI, Dr. Kadir BAL, Dr. Hülya UZUNİSMAİL, Dr. İbrahim YURDAKUL, Dr. Ergun OKTAY, Dr. İsmail DİNÇ

Özet: Aktif inflamatuvar barsak hastalığı olan hastaların kolonlarındaki somatostatin miktarının azalmış olduğu değişik araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada sentetik bir somatostatin olduğu değişik araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada asetik asitle (AA) deneySEL olarak kolit oluşturulan sıçanlarda sentetik bir somatostatin analogu olan sandostatinin (SS) koruyucu etkisi araştırıldı. Vücut ağırlıkları yaklaşık 130-150 G. arasında değişen WA türü toplam 48 sıçan ile çalışıldı. sıçanlardan 34'üne rektal yoldan balonlu kateter vasıtasıyla 3 cc % 5'lik AA verilir ardından da 3 cc hava enfüle edilmek suretiyle kolit oluşturuldu. Kolit oluşturulan sıçanlardan 18'ine hiç bir tedavi uygulanmazken 16'sına lavmandan bir saat önce, lavmandan hemen sonra ve üç saat sonra olmak üzere her seferinde 10 mcg/sıçan dozunda toplam üç kez SS subkutan yolla verildi. Geri kalan 14 sıçana ise kontrol grubu olarak kullanılmak amacıyla serum fizyolojik ile lavman yapıldı. Sıçanlar uygulamadan 24 saat sonra sakrifiye edildi ve en az 10 cm'lik bir distal kolon parçası çıkarılarak temizlendikten sonra makroskopik ve histopatolojik olarak incelendi. Her üç grup arasındaki farklar kolit, kanama, ishal, peritonit, vaskülit ve mortalite varlığına göre değerlendirildi. SS verilen grupta bu kriterlerin şiddetinde anlamlı ölçüde azalma olduğu tespit edildi.

Sonuç: AA ile oluşturulan kolitte koruyucu olarak sandostatin verilmesi mukoza hasarını anlamlı ölçüde azaltmaktadır. İnflamatuvar barsak hastalığının tedavisinde sandostatin kullanılması faydalı olabilir.

Anahtar kelimeler : İnflamatuvar barsak hastalığı, somatostatin

Summary : THE PROTECTIVE EFFECT OF SANDOSTATIN IN ACETIC ACID INDUCED EXPERIMENTAL COLITIS IN RATS

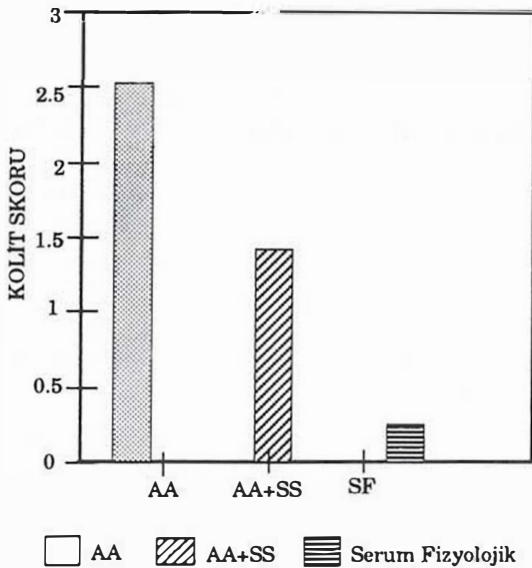
Because of decreased colonic somatostatin production was reported by various researchers in patients with active inflammatory bowel diseases we evaluated the possible modulation of experimental colitis by sandostatin (SS). Colitis was induced in 34 rats (App. 130-150 gbw, WA) by injection of 3cc 5% acetic acid (AA) into the distal colon through the rectum followed by 3 ml of air and 14 control rats were received saline. 16 of 34 rats in the colitis induced group received subcutan SS (10 mcg/rat) one hour prior to and just after and three hours following the injection. All rats were sacrificed 24 hours after damage induction. The colon was isolated, at least 10 cm segment of distal colon resected, lumen rinsed and its damage was macroscopically and histopathologically assessed. Differences between three groups were evaluated according to presence of various degrees colitis, hemorrhage, diarrhea, peritonitis, vasculitis and mortality. Pretreatment with SS significantly decreased this criterions in rats with AA induced colitis.

Conclusion : Pretreatment with SS significantly decreases mucosal damage in AA induced colitis and the using of sandostatin may produce therapeutic benefit in inflammatory bowel diseases.

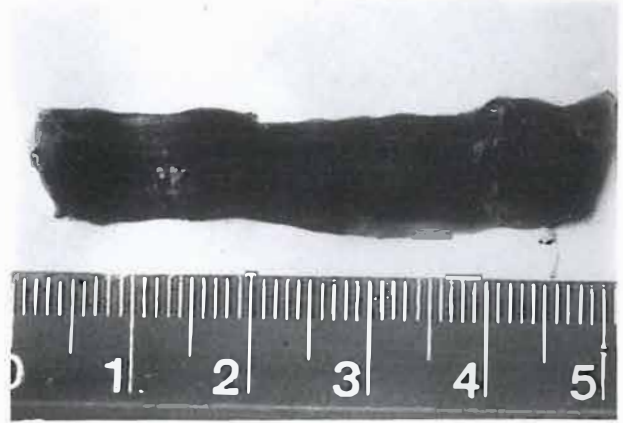
Key words : Inflammatory bowel disease, somatostatin

İlk olarak hipotalamusdan izole edilen ve büyüme hormonunu baskılayan hormon olarak tarif edilen somatostatinin daha sonraları gerek merkezi sinir sistemi, gerek endokrin sistemi ve gerekse gastrointestinal sistem hücrelerindeki sekretuar prosesi engellemesinin yanında T lenfositlerinin çoğalmasını, B lenfositlerinde immunoglobulin yapımını, bazofil ve nötrofillerdeki mediatörlerin salınımını da inhibe ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda hem merkezi sinir sistemi hem de gastrointestinal sistemde bulunan VIP, bombesin, substans P ve somatostatin gibi değişik nöropeptidlerin hormonal etkileri yanında mukozal immün sistem üzerinde modulator etki gösterdikleri anlaşılmıştır (1, 2, 3, 4, 5). Gerçekten son yıllarda inflamatuvar barsak hastalığında (İBH) barsakdaki çeşitli nöropeptitlerin konsantrasyon ve dağılımında değişiklikler görüldüğü ve bu arada mukoza ve submukozadaki somatostatin içeren hücrelerin sayısında belirgin ölçüde azalma olduğu tesbit edilmiştir (1, 2, 3, 6, 9).

Bu çalışmada da barsak duvarındaki somatostatin düzeyinin azalmasının İBH patogenezinde rol oynayan faktörlerden biri olduğu düşüncesi göz önünde bulundurularak sıçanlarda asetik asit (AA) verilerek oluşturulan kolitte sentetik bir somatostatin analogu olan SMS-201'995



Tablo I : AA ve AA+SS verilen gruplar arasında kolit skoruna göre dağılımlar

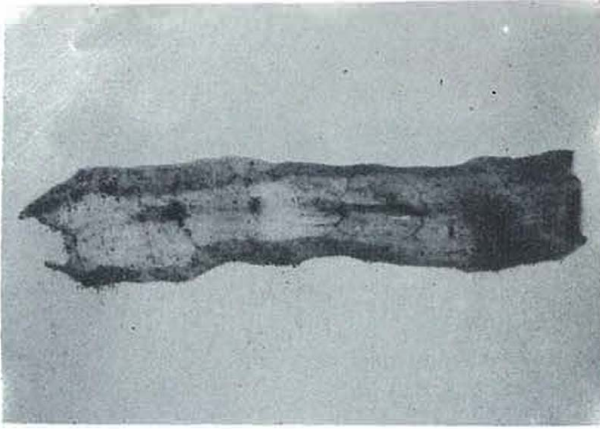


Resim 1 : Sadece AA verilen gruptaki bir sıçandan alınan kalın barsak mukozasının makroskopik görünümü.

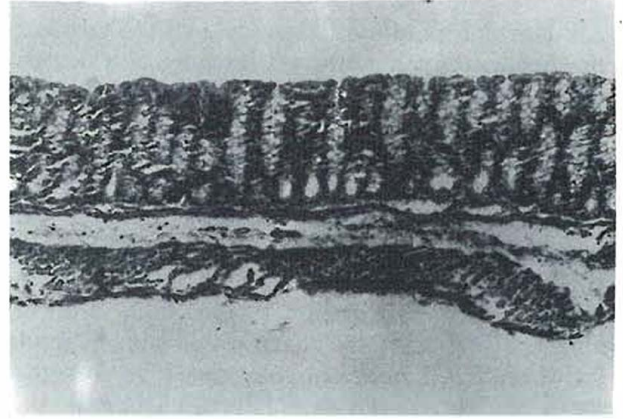
(Sandostatin) in koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

34'ü kolit oluşturulan ve 14'ü kontrol grubunda kullanılan toplam 48 sıçan üzerinde çalışıldı. Sıçanlarda kolit oluşturmak amacıyla 3cc %5'lik asetik asit (AA) rektal yoldan balonlu kateter vasıtasıyla verildikten sonra 3ml hava ensüfle edilerek aktif maddenin daha proksimale ulaşması sağlandı. Yöntem, çalışma öncesinde beş sıçan üzerinde metilen mavisi kullanılarak denendi. Kolit oluşturulan sıçanlardan 18'ine sadece % 5 AA verilirken 16'sına lavmandan 1 saat önce, hemen ve 3 saat sonra olmak üzere toplam üç kez 10 mcg dozunda SMS-201'995 (Sandostatin) (SS) subkutan yaoldan uygulandı. Kontrol amacıyla kullanılan 14 sıçana ise yine aynı yöntem kullanılarak rektal yoldan serum fizyolojik verildi. Bu uygulamalardan 24 saat sonra sıçanlar kurban edilip en az 10 cm'lik kolon segmenti çıkarılarak makroskopik ve histopatolojik olarak incelendi. Her üç grup arasındaki farkların değerlendirilmesinde lezyon skoru, ishal, kanama, peritonit, vastülit varlığı ve mortalite gibi parametreler göz önünde bulunduruldu. Lezyon skorunun saptanmasında: normal veya hiperemik görünüm 0. derece, hücre infiltrasyonunun şiddetine göre sınıflandırılan 1 veya 2 + kolit varlığı 1. derece, fokal mukozal nekroz bulguları 2. derece, mukozal nekroz ve transmural kolit bulguları 3. derece, transmural nekroz bulguları ise 4. derece kolit olarak değerlendirildi. İshal ve makroskopik kanama varlığına anal bölgenin ve çıkarılan kolon



Resim 2: AA+AS verilen gruptaki bir sıçandan alınan kalın barsak mukozasının makroskopik görünümü.



Resim 3: Serum fizyolojik verilen gruptaki bir sıçandan alınan normal yapıda kalın barsak duvarı (HE X 80 denek 40).

segmentinin görünümüne göre, mikroskopik kanama, peritonit ve vaskülit varlığına ise mikroskopik inceleme ile karar verildi. İshal ve peritonit sadece var veya yok şeklinde değerlendirilirken kanama varlığı da 0 dan 3. dereceye kadar evrelendirildi. İstatistiksel analizlerde lezyon skoru ve kanama derecelerine göre dağılımların değerlendirilmesinde parametrik olmayan veriler için uygulanan Mann-

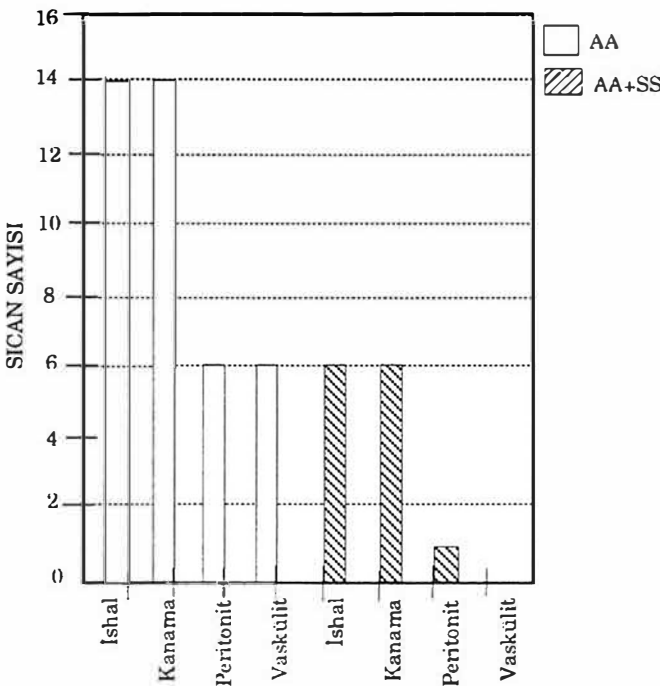
Whitney U testi, ishal, peritonit, vaskülit ve mortalite varlığına göre dağılımların değerlendirilmesinde ise Fisher exact X^2 testi kullanıldı.

SONUÇLAR

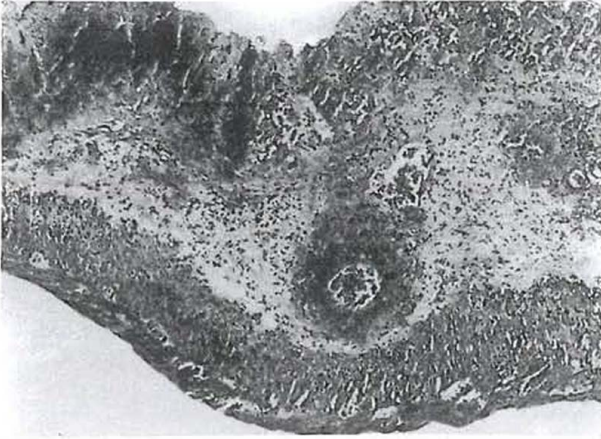
Sadece %5 AA verilen gruptaki sıçanların kolit skoru ortalaması $2,5 \pm 1,2$ iken, %5 AA + SS uygulanan grubunu kolit skoru $1,3 \pm 0,94$ olarak bulundu. Kontrol grubunda ise bu değer $0,07 \pm 0,26$ idi. AA verilen sıçanlardan 10'unda (%55,5), 3 ve 4 derecede lezyon saptanırken AA + SS uygulanan grupta bu oran % 12,5'dü (2 sıçan). Her iki grupta da 2 derece kolit varlığı birbirine çok yakın oranlarda görülürken (sırasıyla % 22,2 ve % 25), 0 ve 1. derece kolit saptanan sıçanların oranı AA verilen grupta % 22,1 (4 sıçan), AA + SS verilen grupta ise % 62,5 (10 sıçan) olarak bulundu. Lezyon skoruna göre dağılımda her iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,002$). Kontrol grubunda ise sadece bir sıçanda 1. derece kolit tesbit edildi (% 7,14) (Tablo I) (Resim 1, 2).

AA verilen gruptaki sıçanlardan % 77,7'sinde (14 sıçan) ishal görülürken AA + SS uygulanan grupta bu oran % 37,5 idi (6 sıçan), ($p < 0,02$). Kontrol grubunda ise hiç bir sıçanda ishal tesbit edilemedi.

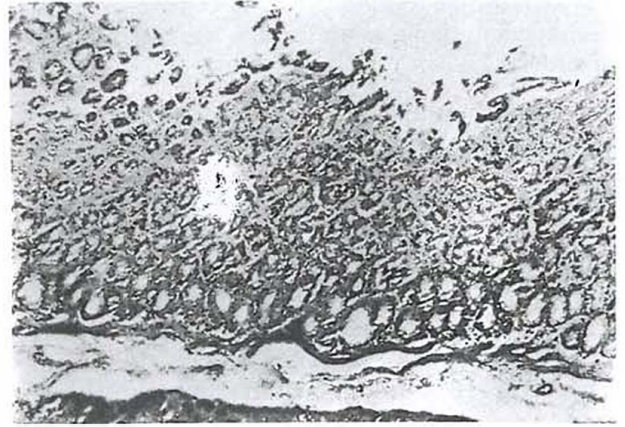
Sadece AA lavmanı yapılan sıçanlardan % 77,8'inde (14 sıçan) 1 ile 3 + arasında değişen derecelerde kanama tesbit edilirken (kanama skoru ortalaması $1,38 \pm 1$), AA + SS verilen gruptaki sıçanların % 37,5'inde (6 sıçan) 1 ve 2. derece kanama saptandı (kanama skoru ortalaması $0,37 \pm 0,6$) ($p < 0,005$). AA + SS verilen grupla



Tablo II : AA ve AA+SS verilen gruplar arasında ishal, kanama, peritonit ve vaskülit varlığına göre dağılımlar.



Resim 4: Sadece AA verilen gruptaki bir sıçandan alınan barsak örneği: Mukozada hemorajik nekroz, submukozada ağır ödem, damarlardan birinde nekrotizan vaskülit iltihabi infiltrasyon (HE X 80, denek 2).



Resim 5: AA+SS verilen gruptaki bir sıçandan alınan barsak örneği: Yüzey epitelinde fokal kayıp, kriptlerde belirgin goblet hücre kaybı, lamina propriada iltihabi infiltrasyon ile karakterize hafif derecede değişiklikler (HE, X80, denek 38).

kontrol grubu arasında kanama yönünden anlamlı fark tesbit edilmedi ($p > 0.05$).

Kolit oluşturulan sıçanlar içinde peritonit saptanan 7 sıçanın 6'sı (% 85,7) sadece AA verilen gruptaydı. Bu gruptaki sıçanlardan % 33'ünde peritonit saptanırken AA + SS kullanılan sıçanlar arasında bu oran % 6,25 idi ($p < 0.05$). Vaskülit yönünden incelendiğinde ise AA verilen sıçanların 6'sında (% 33,2) vaskülit tesbit edilirken AA + SS uygulanan gruptaki sıçanların hiçbirinde vaskülit saptanmadı ($p < 0.01$) (Tablo II) (Resim 3, 4, 5).

Sadece AA lavmanı yapılan gruptaki sıçanlarda mortalite oranı % 55,5 iken SS koruyuculuğu altındaki grupta aynı oran % 31,2 idi ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

İnflamatuar barsak hastalığının (İBH) etyopatogenezi tam olarak anlaşılmamakla birlikte genetik ve ailevi faktörler, HLA sistemi, çevresel faktörler, beslenme alışkanlıkları, stres ve bazı mikroorganizmalar suçlanırken son yıllarda, özellikle enterik nöral sistem, nöropeptitler ve mukozal immünitedeki değişiklikler üzerinde durularak enflamatuar cevabın tayininde bu faktörler arasındaki etkileşime dikkat çekilmektedir (1, 2, 6, 10). Hastalığı iltihabi inflamatuvar değişikliklerin, aktive olmuş immün sistem hücrelerinden kimyasal mediatörler, süperoksit radikaller, trombosit aktive edici faktör (PAF), lökotrienler (LTB₄, LTC₄), tromboksan (TrB₂) ve prostoglandinlerin (PGE₂) salınımı sonucu

oluştugu, remisyonla birlikte bu maddelerin normal seviyelere indikleri bilinmektedir (10, 11). Yapılan araştırmalarda enterik nöropeptitlerin mukozal immünitenin modülasyonunda önemli rol oynadığı anlaşılmıştır. İBH'nın karakteristik bulguları olan inflamasyon, ödem ve düz kaskontraksiyonlarının enterik nöron fonksiyonları ve nöropeptidlerdeki düzensizliklerle beraberlik gösterdiği düşünülmektedir (3, 7, 8). O'Morain tarafından yapılan bir çalışmada Crohn hastalığı olan şahısların rektumlarında VIP ve Substans P ihtiva eden nöronların arttığı saptanmıştır (4). Bu çalışmanın sonuçları, İBH'da adı geçen nöropeptitlerin inflamatuvar cevapta rol oynadığı fikrini desteklemektedir. Öte yandan inflamasyonlu mukozada bu nöropeptidlerin artması yanında somatostatin miktarındaki azalmanın da patogeneze önemli rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (1, 9, 12). Koch ve Toshioki şiddetli koliti olan İBH'lı hastaların kolonlarında somatostatin ihtiva eden hücrelerin sayısında belirgin ölçüde azalma olduğunu, hastalığın iyileşmesi ile gerek bu hücrelerin gerekse salgılanan somatostatinin normal seviyelere yükseldiğini göstermişlerdir (1, 9). İBH'da somatostatin salgılayan hücrelerdeki azalmanın sebebi kesin olarak bilinmemektedir. Ponde ve arkadaşları barsaktaki somatostatin salgılayan hücrelerin kript tabanlarındaki progenitör hücrelerden kaynaklandığını ve inflamasyon sırasında oluşan kript apseleri nedeniyle bu hücrelerin sayısında azalma olduğunu ileri sürmüşlerse de (13) draha sonra yapıla

araştırmalarda aynı hücrelerin kript apsisi bulunmayan mukoza kısımlarında da azaldığı gösterilmiştir (1, 8).

Somatostatinin barsak mukozasındaki koruyucu etkisi hakkında farklı fikirler ileri sürülmekte, c-AMP nin inhibisyonu ve kalsium artışının bloke edilmesi şeklinde iki inhibitör mekanizma üzerinde durulmaktadır (1). Önceki yayınlarda somatostatinin, VIP ve substans-P'nin aksine bir inhibitör barsak hormonu şeklinde etki göstererek barsaklardaki sıvı sekresyonunu azalttığı (14), Payer plaklarındaki lenfositlerin proliferasyonunu ve immunglobulin sentezin inhibe ettiği, T lenfositlerin çoğalmasını ve bu hücrelerden sitokinlerin salınımını azalttığı bildirilmiştir (14). Eliakim ve arkadaşları deneysel kolit oluşturulan sıçanlarda yaptıkları çalışmada kolondaki LTB₄, PGE₂ ve PAF miktarlarında artma saptarken somatostatin seviyelerinde belirgin miktarda azalma olduğunu tesbit etmişler ve aynı çalışmada somatostatin koruyuculuğu altında kolit oluşturulan sıçanların kolonlarındaki LTB₄, PGE₂ ve PAF seviyelerini önceki gruba göre anlamlı ölçüde düşük bulmuşlardır (12). Somatostatin miktarındaki azalmanın İBH patogenezinde kesin ve olayı başlatan bir faktör olmadığı ancak hormonun inflamasyonla birlikte azalmaya başlamasının, yukarıda bahsedilen

etkileri sebebiyle iltihabın şiddetlenmesin sağladığı kabul edilmektedir (1, 15).

Çalışmamızda sandostatin koruyuculuğu altında kolit oluşturulan sıçanlarda inflamasyonun şiddetine ait parametreler sandostatin verilmeyen gruba göre anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar literatürle uyumluluk göstermekte ve somatostatinin İBH'ında muhtemelen yukarıda bahsedilen mekanizmalar vasıtası ile kendini gösteren bir koruyucu etkis olduğu görüşünü desteklemektedir.

SONUÇ

Çalışmamızın sonuçları ve literatür bilgileri beraberce irdelendiğinde şu sonuçlar çıkarılabilir:

- 1- Sıçanlarda asetik asitle oluşturulan deneysel kolitte sandostatin anlamlı derecede koruyucu etki göstererek inflamasyonun şiddetini azaltmıştır.
- 2- Somatostatinin azalması inflamasyonun başlamasında pirimer rol oynamamakla birlikte yukarıda bahsedilen etkiler nedeniyle olayın şiddetlenmesine katkıda bulunmaktadır.
- 3- Sentetik bir somatostatin analogu olan Sandostatin İBH tedavisinde kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Toshiaki Vatanabe, et al: Distribution and quantification of somatostatin in inflammatory diseases. *Dis-Colon-Rectum*. 1992;35(5): 488-94.
2. Debas HT. et al: Neuroendocrine Design of the Gut. *Am Surg*. 1991: 161-243-9
3. O' Doriso MS: Neuropeptides and gastrointestinal immunity. *Am J Med* 1986; 81:74-82.
4. Mayer EA, Raybould H et al: Neuropeptides inflammation and motility. *Dig Dis Sc*: 1988; 136: 152-6.
5. Stanis AM, Befus D, et al: Differential effects of vasoactive intestinal polypeptide substance P and Somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and spleen. *J Immunol* 1986; 136: 152-6.
6. Donatson MR, Cello J, Schneiderman D: Inflammatory bowel diseases in : *Gastrointestinal diseases*. H. Sleisenger, Fordtran, WB Saunders Company-Philadelphia, fourth edition, 1989; 1327-1477.
7. O' morain C. et al: Vasoactive intestinal peptide Concentrations and immunocytochemical studies in rectal biopsies from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1984; 25:57-61.
8. Koch TR, Carney JA et al: Distribution and quantitation of gut neuropeptides in normal intestine and inflammatory bowel diseases. *Dig. Dis Sc*: 1987; 32: 369-76.
9. Koch TR, Carney JA et al: Somatostatin in the idiopathic inflammatory bowel diseases. *Dis Colon Rectum* 1988; 31:
10. Jagaarhi V. et al: Current Concepts of the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol*. 1991 86(11): 1566-1572.
11. Fiocchi C et al: Interleukin - 2 activity of human intestinal mucosa mononuclear cells. Decreased level in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1984; 86: 734-42.
12. Eliakim R, Karmeli F, et al: Sandostatin, effectively prevents Colonic mucosal damage in acetic acid induced colitis. *Gastroenterology* 1992; Abstr. A: 691.
13. Ponder BA, Schimdt GH et al: Derivation of moose intestinal crypts from single progenitor cells. *Nature* 1985; 313: 689/91.
14. Dharmasathaphon K et al: Somatostatin inhibits fluid secretion in the rat jejunum *Gastroenterology* 1980; 78: 1564-8.
15. Mantyh PW, Catton M: Alterations in receptors for sensory neuropeptides in human inflammatory bowel diseases. *Adv-Exp-Med-Biol* 1991; 298: 253-83.