

Ratlarda Defonksiyone İnce Barsak Segmenti Üzerinde Rekombinant Human Growth Hormone Çinko Sülfat ve L-Glutamin'in Trofik Etkileri

TROPHIC EFFECTS OF RECOMBINANT HUMAN GROWTH HORMONE ZINC SULPHATE, AND L-GLUTAMINE ON DEFUNCTIONED SMALL BOWEL IN RATS

Dr. Adil KARTAL (*), Dr. Alaatin DİLSİZ (**), Dr. AYTEKİN KAYMAKÇI (**), Dr. Serdar YOL (*), Dr. Selçuk DUMAN (***), Dr. Murat AKTAN (**)

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi ABD (*), Çocuk Cerrahisi ABD (**), Histoloji ABD (***), KONYA

ÖZET

Amaç: Ratlarda defonksiyone ince barsak segmenti üzerinde bir hormon ve iki nutrientin etkisini araştırmaktır.

Durum değerlendirilmesi: Daha önceki çalışmalarda bu maddelerin barsak üzerindeki etkisi fonksiyone insan ve hayvan barsakları üzerinde çalışarak gösterilmiştir. Defonksiyone ince barsak segmentinde çalışılmamıştır.

Yöntem: Defonksiyone ince barsak segmentini oluşturmak için, damarlanması korunmuş 15 cm uzunluğunda bir jejunum segmenti karın ön duvarına ikili mukus fistülü şeklinde ağızlaştırıldıktan sonra intestinal süreklilik jejunojejunostomi ile sağlandı. Ratlar 10 ar deneklik olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Tüm gruplar oral olarak standart total parenteral nutrisyon (TPN) solüsyonu ile beslendi. 1. gruba (kontrol) yalnız oral TPN solüsyonu verildi, diğer gruplara oral TPN solüsyonuna ek olarak sırası ile 2. gruba rekombinant human growth hormon (0.4 mg/kg/gün); 3. gruba çinko sülfat (1.0 mg/kg/gün); 4. gruba L- glutamin (0.2 g/kg/gün); 5. gruba (kombinasyon) hormon ve iki nutrient aynı dozlar da birlikte verildi. Üçüncü haftanın sonunda tüm ratlara laparotomi yapıldı. Defonksiyone ve fonksiyone segmentleri villus boyları ve musin (Goblet hücre sayıları) yönünden ışık mikroskopik düzeyde değerlendirildi.

Çıkarımlar: Villus boyları ve Goblet hücre sayıları yönünden bu iki parametrede tüm gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi.

Sonuç: Ratlarda defonksiyone ince barsak segmenti üzerinde adı geçen hormon ve nutrientin olumlu etkilerinin olduğu ve atrofiyi engelledikleri görüldü. En iyi sonuçlar kombinasyon grubunda izlendi.

Anahtar Kelimeler: Defonksiyone ince barsak, rhGH, Çinko Sülfat, L- Glutamin, Goblet hücresi, Villus

SUMMARY

The aim of this study is to investigate the effect of two nutrients and one hormone on defunctioned intestinal segment in rats. A vascularized jejunal loop of 15 cm in length was prepared and separated from the intestine and its two ends brought out through the abdominal wall as mucous fistulas. Intestinal continuity was restored by jejunojejunostomy. The rats were divided in to five groups, each

of which had 10 animals. All groups had standard nutrition by oral route. First group (control) received only oral parenteral nutrition (TPN) solution, in addition to oral TPN solution the second group had recombinant human growth hormone (0.4 mg/kg/day), 3rd group ZnSO₄ (1.0 mg/kg/day), the 4th group L- glutamine (0.2 g/kg/day) and the 5th group combination of last three additives with the same dosages. At the end of the third week, all rats underwent laparotomy. The defunctioned and functioned segments were resected for mucin (Goblet cells were counted) and length of villi at light microscopic level to evaluate histological criterias. For the examined two parameters all experiment groups showed statistical meaningful results.

In conclusion it is observed that the mentioned hormone and nutrients have trophic effects on rat defunctioned intestinal segment. They also have a protective effect for intestinal atrophy. The best results were obtained in the combined group.

Keywords: Defunctioned intestinal loop, rhGH, ZnSO₄, L-Glutamine, Goblet Cell, Villi

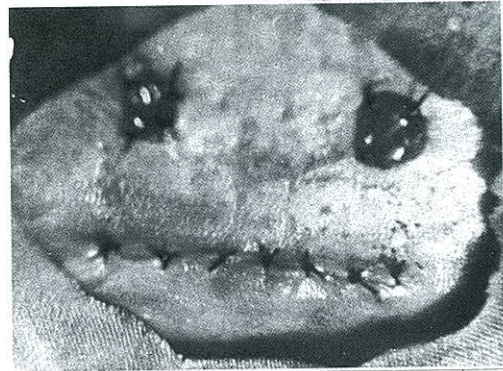
Rekombinant human growth hormon (rhGH), insan barsak katmanları üzerinde, özellikle geniş barsak rezeksiyonlu insan ve hayvanlarda, olumlu etkilerinin yanında nutrientlerin (aminoasit ve ionlar gibi) barsaktan emilimini artırır. RhGH'nun ayrıca yara iyileşmesini hızlandırdığı ve beslenme desteği gereken cerrahi hastalarda protein kazanımını da sağladığı bilinmektedir (1,2,3,4). Metabolizmanın tüm aşamalarında görev alan ve yüzden fazla enzimin bir komponenti olan oligoelement çinkonun (Zn) barsak mukozası üzerinde yararlı etkileri vardır (5,6). L- glutaminin (L- GLT) de barsak mukoza hücreleri için önemli bir yakıt olduğu, bakteriyel translokasyonu önlediği ve nitrojen ekonomisini düzenlediği kanıtlanmıştır (1,7,8,9). L- GLT enterositlerce gerek arteriyel gerekse daha önemli olarak lümeninden alınarak kullanılabilir (10).

Yukarıda verilen bilgilerin çok büyük bir kısmı fonksiyone insan veya hayvan barsakları üzerinde elde edilen sonuçlara dayanmaktadır. İntestinal sistem sürekliliğinden ayrılmış fakat canlılığı organizmada süren defonksiyone segment (DS, içinden barsak içeriği geçmeyen) rhGH, Zn ve L- GLT'in nasıl bir etki yaptığı pek araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı DS'te rhGH, Zn ve L- GLT'in etkisini ortaya koymaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma 1996 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi, Çocuk Cerrahisi ve Histoloji Anabilim Dallarının işbirliğiyle gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlığı 250-300 g olan Wistar albino türü 50 erkek rat kullanıldı. Özel kafeslerde barındırılan ratlar ameliyattan

önce 12 saat süre ile aç bırakıldı. Eterle (inhalasyon anestezisi) uyutulan ratların karınları gerekli hazırlıklardan sonra steril koşullarda 4 cm lik orta hat kesisiyle açıldı. Treitz ligamanından 10 cm distalde 15 cm uzunluğunda bir jejunum segmenti vasküler yapısı korunarak intestinal sistemden ayrıldı. İntestinal süreklilik jejunojejunostomi ile sağlandı. Ayrılan segment serum fizyolojikle irrigasyondan sonra kesinin sol yanında iki ayrı jejunostomi (mukus fistülü) şeklinde karın duvarına ağızlaştırıldı (Resim 1). Postoperatif dönemde denekler bir gün kesinin altına Isolayt M solüsyonu verilerek beslendi, sonra oral beslemeye geçildi. ikinci gün opere ratlar 10'ar adetlik 5 gruba ayrıldı.



Resim 1. Defonksiyone jejunum segmentinin karın ön duvarına ikili jejunostomi şeklinde ağızlaştırılması.

Birinci gruptaki (kontrol grubu) denekler standart total parenteral beslenme (TPN) solüsyonu (Aminosteril L-400 (Fresenius AG) 1.5 g nitrojen/kg/gün ve %30'luk hipertonik glukozdan 100 Kcal/kg/gün karışımı) ile oral olarak beslendi. Her deneğe ayrıca 200 cc içme suyu ayrı şişeye konularak verildi.

İkinci gruptaki deneklere kontrol grubundaki eş beslenmeye ek olarak 0.4 mg/kg/gün rhGH (Genotropin, 3 IU/mg Kabi Pharmacia, Sweden) iki doz halinde deri altına uygulandı.

Üçüncü gruptaki deneklere oral standard TPN solüsyonuna 1mg/kg/gün çinkosülfat eklendi.

Dördüncü gruptaki deneklere standard TPN solüsyonuna ek olarak L- glutamin (0.2 g/kg/gün) (E, Merck D 6100 Darmstadt, F. R., Germany) gavajla verildi.

Beşinci gruba (kombinasyon grubu) oral TPN solüsyonu ile birlikte önceki gruplara eş dozlarda rhGH + Zn + L- GLT verildi.

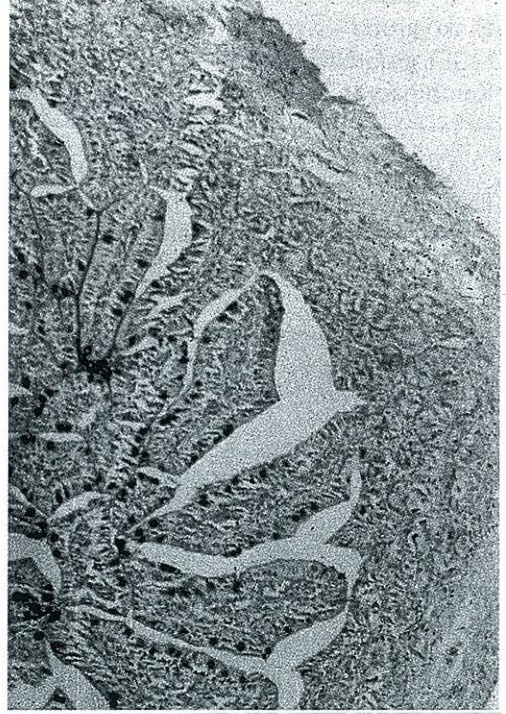
Yirmibirinci günün sonunda tüm deneklere relaparotomi yapılarak defonksiyone jejunum segmentleri ve anastamozun proksimal ve distal 5'er cm'sini içerecek şekilde jejunum (fonksiyone segment, FS) çıkarıldı.

Çıkarılan barsak segmentleri makroskopik olarak değerlendirildi. DS'lerin ortalarından ve FS'lerin proksimal ve distal uçlarından alınan örneklerden hazırlanan preparatlar hematoksil-eozin ve Periyodik Asit Schiff (PAS) tekniğiyle boyandı. Işık mikroskopunda rastgele seçilen 6 alanda (X 40) objektif büyütme ile goblet hücreleri (müsin değerlendirilmesi için) sayıldı. Villus boyları da oküler mikrometre ile ölçülerek saptandı.



Resim 2: Kontrol grubunda DS te villus atrofi görülmektedir (H&E, X 40).

İstatistiksel değerlendirmeler; her 5 gruptaki değişkenler tek yönlü varyans analizi ile (ANOVA) karşılaştırılarak yapıldı. Farklı olan grubun tespitinde Tukey HSD testi kullanıldı. Aynı grubun DS ve FS'leri villus ve goblet hücreleri yönünden karşılaştırılırken Student t testi kullanıldı.



Resim 3: Rh GH grubunda DS te goblet hücre sayılarında belirgin bir şekilde artışla birlikte villus boylarında artma görülmektedir (PAS, X 40)

SONUÇLAR

Deneklerden kaybedilen olmadı. Makroskopik değerlendirmede yalnız kontrol grubunun DS'inde gözle görülür bir atrofi izlendi. Bu görünüm mikroskopik olarak da kanıtlandı (Resim 2). Kontrol grubunun FS'inde mukozanın lamina propriasında lenfosit infiltrasyonu görüldü.

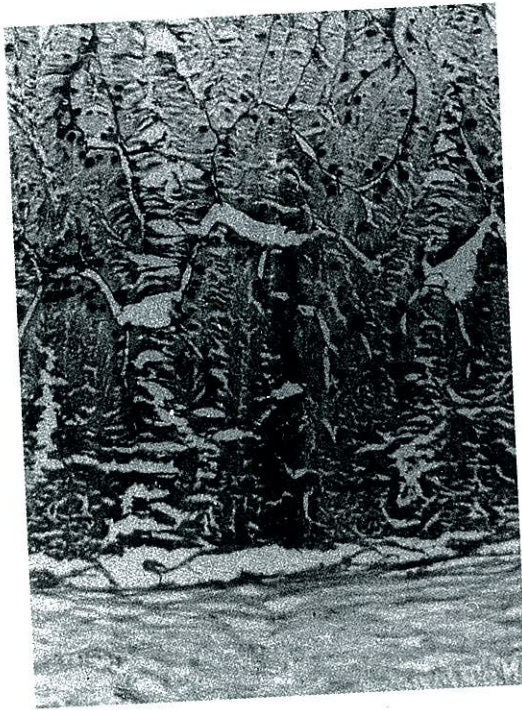
Çalışma gruplarının DS'lerdeki villus boyu ve goblet hücre sayısı Tablo 1'de gösterilmiştir.

İkinci grupta (rhGH grubu) DS'te villus boylarında ve prizmatik epitel hücrelerinin yüksekliğinde ve goblet hücre sayısında artış ($p < 0.001$) gözlemlendi. Ayrıca kas tabakasında kalınlık artışı görüldü. Seroza normaldi (Resim 3). FS de villus boylarında artışla birlikte goblet hücre sayısında da belirgin artış gözlemlendi. Kas tabakasında kalınlık artışı izlenirken seroza normaldi.

Tablo 1. DEFONKSİYONE SEGMENTLERDEKİ VİLLUS BOYU VE GOBLET HÜCRE SAYILARININ GRUPLARA GÖRE DAĞILIMI

Grup	Villus boyu (μm) (Art.ort \pm SD)	Goblet hücre sayısı (Art.ort \pm SD)
Kontrol (n=10)	215.00 \pm 28.85	24.00 \pm 7.73
rhGH grubu (n=10)	267.58 \pm 44.34	57.50 \pm 18.35
Çinko grubu (n=10)	253.00 \pm 31.00	42.44 \pm 6.87
L-GLT grubu (n=10)	339.50 \pm 57.11	48.01 \pm 6.65
Kombinasyon (n=10)	377.26 \pm 20.13	65.15 \pm 11.21

Üçüncü grupta (Zn grubu) hem DS hem de FS'in epitelyal tabakasında hiperplazi, goblet hücrelerinde sayısal artış vardı (Resim 4) ($p < 0.05$).



Resim 4. Çinko sülfat grubuna ait DS'te tunika mukoza, müskularis ve adventisyanın morfolojik bütünlüğü sağlıklı ve goblet hücre sayısında da artış görülmektedir (HxE, X 40)

Dördüncü grupta, (L-GLT grubu) DS'te villus boylarında uzama ($p < 0.001$) ve goblet hücrelerinde artış ($p < 0.01$) görüldü, kas tabakasında da kalınlaşma dikkati çekmiştir (Resim 5). Gruplardaki kas tabakasındaki değerlendirmeler panoramik görüntüye göre olumlu bulunmuş, ancak teknik güçlük nedeniyle istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

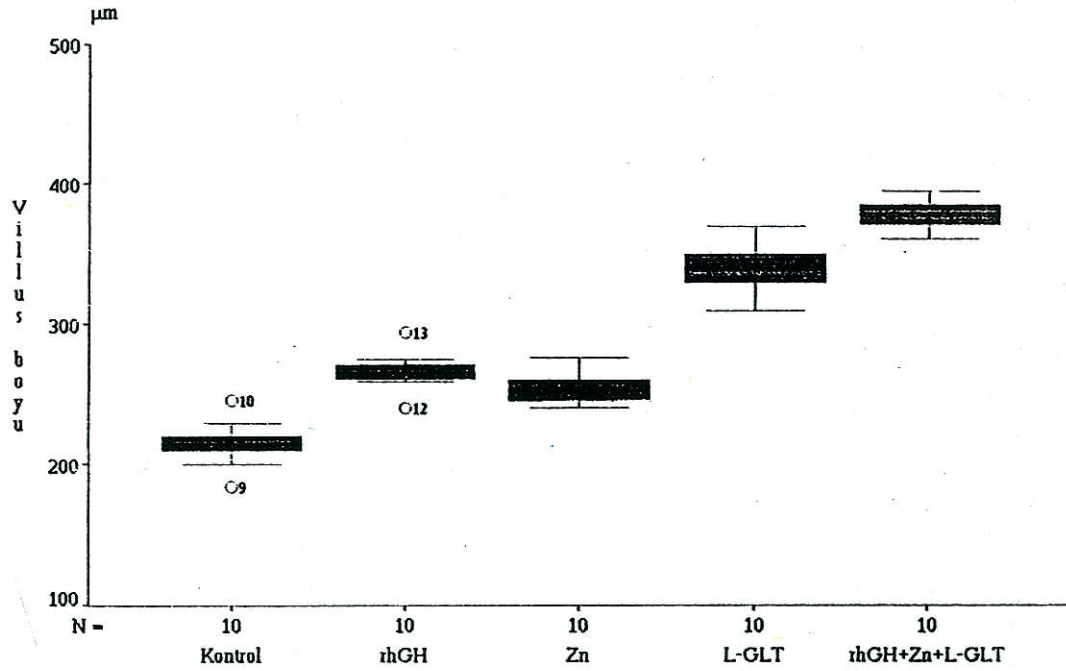
Beşinci grupta FS ve DS'lerde villus boylarında ileri derecede hipertrofi ($p < 0.001$) ve artmış goblet hücreleri ($p < 0.001$) gözlemlendi, kas tabakalarında da bu abartılı görüntüler saptandı (Resim 6).



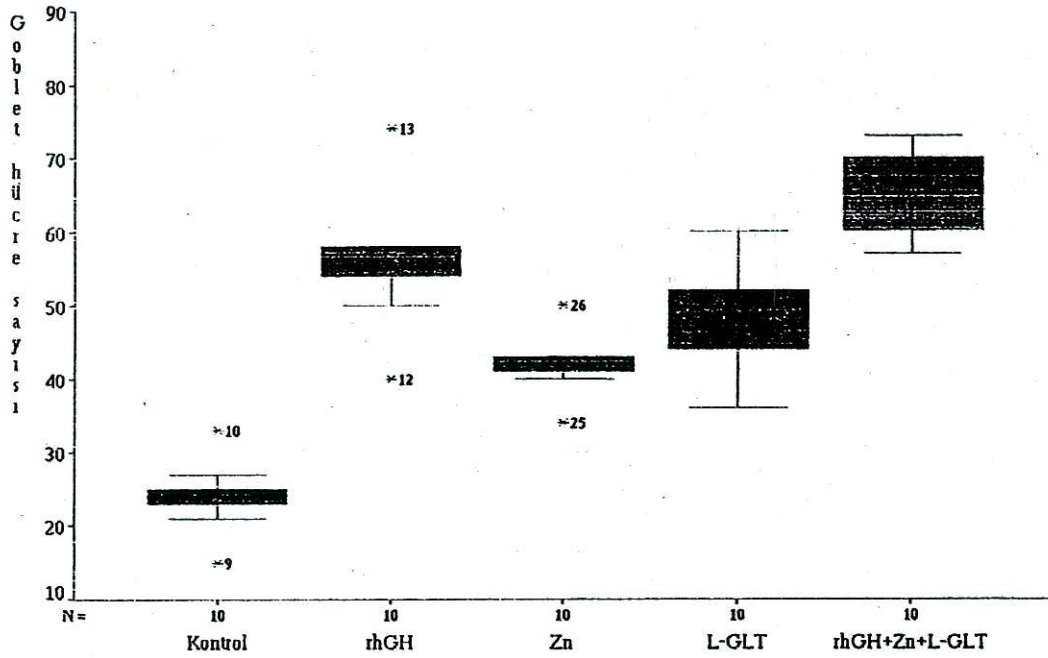
Resim 5: L- glutamin grubuna ait DS te kas kalınlığında kontrol grubuna göre belirgin bir artış yanında villus boylarında da artış dikkati çekmektedir (PAS, X 40)

Tüm gruplarda FS ve DS'in villus boyları karşılaştırıldığında en iyi değerler sırasıyla grup 5 (kombinasyon), 4 (L-GLT), 2 (rhGH) ve 3 (Zn) olarak bulundu. Goblet hücreleri için segmentler karşılaştırıldığında en iyi sonuçlar sırasıyla grup 5, 2, 4 ve 3 şeklinde dizildi (Şekil 1, 2).

Her grubun FS'i DS ile kendi içinde karşılaştırıldığında FS lerin DS lere göre hem villusların



Şekil 1: Likid gıda ile beslenen ratlarda villus boyları üzerine hormon ve nutrientlerin etkisi

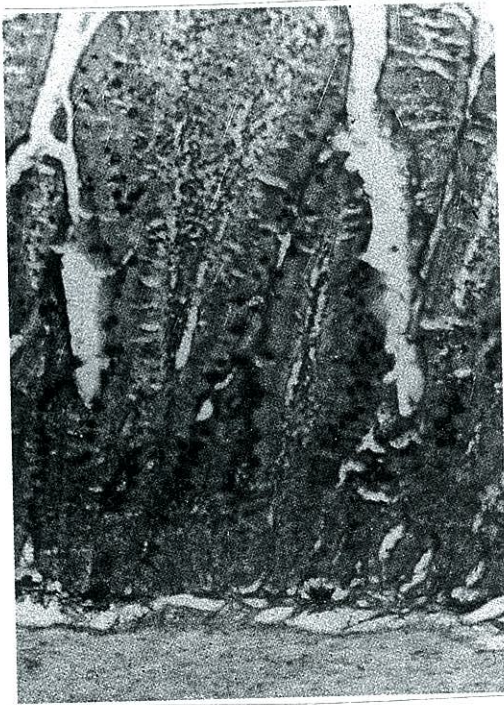


Şekil 2: Likid gıda ile beslenen ratlarda goblet hücre sayısı üzerine hormon ve nutrientlerin etkisi

yüksekliği hem de goblet hücreleri yönünden daha iyi bulundu.

TARTIŞMA

Literatürde beslenme desteklerinin defonksiyone barsak üzerindeki etkilerinin ne olacağı pek araştırılmamıştır (11). Çalışmamızda uygulanan modelde bir jejunum segmenti ikili mukus fistülü şeklinde karın duvarına ağızlaştırılmış ve fonksiyon dışı tutulan bu bölüme adeta parenteral beslenme özelliği kazandırılmıştır. Standart parenteral beslenme solüsyonları oral olarak kullanılarak hem bu solüsyonların oral alınmaları halinde barsak katmanlarında nelerin vuku bulacağı hem de bu solüsyonlara rhGH, Zn ve L- GLT'in eklenmesiyle sonuçlarda ne gibi değişiklikler olabileceği esas alınmıştır.



Resim 6. Kombine (RhGH+ Zn+ L-glutamin) grubuna ait DS te goblet hücrelerle birlikte lamina epitelyalısın altındaki hücrelerde proliferasyon ve villus boyu uzunluğunda artış görülmektedir (PAS, X40).

Nitrojen birikimi ve protein sentezinde rolü vurgulanan (1), kısa barsak sendromu geliştirilen sıçanlarda adaptasyonu sağladığı gösterilen (12), rhGH ile ilgili bir çalışmada defonksiyone rat kalın barsağı üzerinde büyüme hormonunun

kontrol grubuna oranla mukozal yüzeyi genişlettiği, mukoza ve müsküler tabakanın ağırlığını artırdığı saptanmıştır (11). Bu çalışmada DS'nin kolon olması (Hartmann kolostomi) yönüyle çalışmamızdan model olarak farklıdır. Ancak çalışılan ortak parametrelerde sonuçlar büyük oranda benzerdir.

Geofajide çinko eksikliğine bağlı olarak villusların kısaldığı ve küntleştiği kanıtlanırken, yüksek bölünme hızına sahip ince barsak mukoza hücrelerinin çinko eksikliğinde morfoloji ve fonksiyonlarını kaybettiği görülmüştür. Total parenteral beslenme sonucu gelişen mukozal lezyonların da çinko eksikliğine bağlı olduğu düşünülmüştür. Gerek geofajide gerekse TPN sonucu gelişen mukozal lezyonlar oral çinko verilmesi ile düzelmektedir (5). Çinkonun, 5FU'nun barsak mukoza epiteli üzerinde yaptığı hasarı anlamlı ölçüde önlediği gösterilmiştir (13). Çalışmamızda da çinko verilen gruptaki sonuçlar kontrol grubuna göre anlamlı (FS ve DS'de) ($p < 0.05$) bulundu. Yine çinkonun FS ve DS'leri kendi içinde kıyaslanırken fark FS lehine anlamlı çıkmıştır.

L-GLT in katabolik hallerde nitrojen dengesini koruduğu, barsakta mukozal atrofiyi, bakteriyel translokasyonu önlediği, aynı zamanda barsak immün fonksiyonunu düzelttiği insan ve hayvanlardaki invitro ve invivo çalışmalarla gösterilmiştir (12,14,15). Literatürde modelimize benzer defonksiyone barsak segmenti üzerinde L-GLT'in etkilerini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. L-GLT hem lümen hem de arteriyel yolla barsak mukoza hücreleri tarafından kullanılabilirdiğinden (10,14) DS üzerindeki etkilerini tahmin etmek güç olmasa gerek. Nitekim çalışmamızdaki sonuçlar DS üzerinde gavaj yoluyla verilen L-GLT'in etkili olduğu ve kontrol DS'ye göre atrofinin bulunmadığı ($p < 0.001$) ortaya konmuştur. İntestinal süreklilik dışına alınan DS'in arteriyel yapısı korunduğundan barsak mukoza hücreleri L-GLT'i sistemik dolaşımdan almışlardır. L-GLT grubunun FS ve DS'leri kendi aralarında kıyaslandığında FS'in villus boyu ve goblet hücre sayısı yönünden daha iyi olduğu görülmüştür ($p < 0.01$). L-GLT grubunun DS'i kontrol DS'inden daha iyidir ($p < 0.001$). Çünkü kontrol grubunda L-GLT hiç bulunmazken, L-GLT'in sadece arteriyel yolla verilmesi bile kontrol DS'ye anlamlı fark yapmaya yetmektedir. L-GLT grubunun FS'i DS'inden daha iyi iken fark önceki kadar çok anlamlı değildi, çünkü FS hem lümen-den hem de emilim sonrası damardan beslenirken, DS yalnız damardan beslenmektedir.

rhGH, L-GLT ve modifiye liften zengin bir diyetin birlikte verildiği kısa barsak sendromlu hastalarda geriye kalan barsağın kompansasyonunu arttırdığı ve emilimi düzelttiği insanlarda gösterilmiştir (16). Çalışmamızda da rhGH, Zn ve L-GLT'in aynı dozlarla kombine edildiği 5. gruptaki değerler diğer gruplara oranla en iyi trofik sonuçları vermiştir. Villuslar en yüksek boya ulaşırken, goblet hücrelerinde de ileri derecede artış gözlenmiştir. Bu olumlu etki muhtemelen rhGH ve diğer iki nutrient arasındaki sinerjizm ile açıklanabilir.

Sonuç olarak ratlar üzerinde yapılan bu çalışmada kombinasyon grubu, hem villuslar hem de müsün için en iyi trofik etkiyi gösterdi. Kombinasyon grubundan sonra en iyi sonuçlar villuslar üzerinde, sırasıyla L-GLT, rhGH ve Zn ile elde edilirken, goblet hücreleri (müsün) için sonuçların kombinasyon grubundan sonra yine sırasıyla rhGH, L-GLT ve Zn şeklinde dizildiği görüldü.

Yine bu çalışmada DS oral olarak beslenen bir ratta büyük oranda TPN alan bir segment gibi görüldüğünden TPN in olumsuz etkilerinin rhGH, Zn ve L-GLT in kombinasyonu veya her biriyle ayrı ayrı anlamlı ölçüde önlenemediği ve modelimizin bu tür çalışmalar için iyi bir örnek oluşturabileceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. Byrne TA, Morrisey TB, Gatzen C, et al : Anabolic therapy with growth hormone accelerates protein gain in surgical patients requiring nutritional rehabilitation. *Ann Surg* 1993, 218: 400-418.
2. Gilpin DA, Barrow RE, Rutan RL, Broerning L, Herndon DN: Recombinant human growth hormone accelerates wound healing in children with large cutaneous burns. *Ann Surg* 1994, 220: 19-24.
3. Guarino A, Canani RB, Lafusco M, Casola A, Russo R, Rubino A: In vivo and in vitro effects of human growth hormone on rat intestinal ion transport. *Pediatr Res* 1990, 37(5) : 576-80.
4. Zaizen Y, Ford EG, Shimada H, Kosi M, Costin G, Atkinson J B. Growth hormone effects on wound healing in malnourished animals: A histological study. *Eur J Pediatr Surg* 1995, 5: 226-230.
5. Arcasoy A, Avdar A. O, Cin Ş, Babacan E, Gözdaşoğlu S: Zinc absorption in geophagia and effect of zinc treatment on intestinal mucosa. *Nutrition Res (Suppl)* 1985, 161-165.
6. Çertuğ A: Klinik nütrisyon eser elementler ve vitaminler. Klinik Nütrisyon Sempozyumu. Büyük Efes Oteli, İzmir, 10 Şubat 1993, 9:37-51.
7. Alexander JW: Immunoenhancement via enteral nutrition. *Arch Surg* 1993, 128: 1228-1229.
8. Burke DJ, Alverdy JC, Aoye E, Moss GS: Glutamin supplemented total parenteral nutrition improves gut immune function. *Arch Surg* 1989, 124: 1396-1399.
9. Fürst P, Albers S, Stehle P: Evidence for a nutritional need for glutamine in catabolic patients. *Kidney International* 1989, 36: 287-292.
10. Windmueller H G : Glutamine utilization by the small intestine. *Adv Enzymol* 1982, 53: 202-237.
11. Kismeyer Nielsen P, Christensen H, Laurberg S: Trophic effects of biosynthetic growth hormone on normal and defunctioned left colon in rats. *Scand J Gastroenterol* 1995, 30: 246-251.
12. Gomez de Segure, Agullera M J, Codesal J, De-Miguel E: Administration of growth hormone enhances the intestinal adaptive response after resection of small intestine in rats. *Rev Esp Enferm Dig* 1995, 87 (4): 288-93.
13. Tümer AR, Kama NA, Müftüoğlu SF, Dener C, Tümer L, Dağdeviren A: 5 FU intraperitoneal kullanımında intestinal anastomoz üzerine olan olumsuz etkisinin çinko ile engellenmesi. *Türk J Gastroenterol* 1996, 7: 72-81.
14. Souba WW, Klimberg VS, Plumley DA, et al. : The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection. *J Surg Res* 1990, 48: 383-391.
15. Van Der RRWJ, Van Kreel BK, Von Meyenfeldt MF, et al. : Glutamine and preservation of gut integrity. *The Lancet* 1993, 341: 1363-1365.
16. Byrne TA, Persinger RL, Young LS, Ziegler TR, Wilmore DW : A new treatment for patients with short bowel syndrome, Growth hormone, glutamin and modified diet. *Ann Surg* 1995, 222: 243-255.

YAZIŞMA ADRESİ:

Dr. Adil KARTAL

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Genel Cerrahi ABD,

42080 KONYA