

Benzalkonium klorid ile oluşturulan intestinal aganglionozis modelinin irdelenmesi

Gökhan GÜNDOĞDU, Erdal POLAT, Reyhan OKTAY, Mehmet ELİÇEVİK, Gonca T TEKANT, Sergülen DERVİŞOĞLU, Sinan CELAYİR

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi, Patoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalları, İstanbul

Özet

Amaç: Benzalkonium klorid ile deneysel aganglionozis oluşturulması modelinin (DAM) sorgulanması ve literatür değerlendirilmesi.

Gereç ve Yöntem: Çalışma her grupta 10'ar adet Sprague-Dawley sıçan ile geç dönem (GD-1), geç dönem kontrol grup (GD-2) ve aganglionoziste erken dönem (ED) değişiklikler olarak 3 grup denekte yapıldı ve ayrıca ek olarak 4 adet denekte de uzun segment aganglionozisin klinik etkileri gözlemlendi. Tüm deneklere işlem öncesi ve sonrasında anatomik değişiklikleri gözlemek amacı ile lavman opak grafler çekildi. Ganglion değişiklikleri histopatolojik olarak değerlendirildi. Deneklerin klinik değişiklikleri izlendi.

Bulgular: GD-1 deneklerde çalışmanın başında tıkanıklık bulguları görülse de geç dönemde bu bulgular tamamen düzeldi. Bir denek dışında çalışma sonunda GD-1 deneklerin lavman opak grafleri normal bulundu. GD-1 de kilo kaybı mevcuttu ($p<0.05$). GD-1 deneklerde histopatolojik incelemede normal sayıda hücre dağılımı ve ganglion hücreleri saptandı. Kontrol grupta klinik veya histopatolojik değişiklik saptanmadı. Erken dönem çalışma grubunda ise deneklerin histopatolojisinde ganglion sayılarında azalma ve dejenerasyon saptandı. Uzun segment aganglionozis işlemi yapılan 4 denekte ileri derece ileusa bağlı erken dönemde ölüm görüldü.

Sonuç: Çalışmamızda elde edilen bulgular modeli destekleyen önceki çalışmalarla uyumsuzdur. Yaptığımız literatür araştırmalarına göre bu geçici aganglionozis kliniğinin erken dönemde ganglionlarda oluşan dejenerasyona bağlı olduğu ve nöronal plastisite fenomenine bağlı olarak yeni nöron gelişimi ile de kliniğin düzeldiğini düşünmekteyiz. Sonuç olarak DAM geçici olarak aganglionozis kliniğine yol açmakta ve gerçek bir Hirschsprung hastalığı modeli oluşturamamaktadır.

Anahtar kelimeler: Aganglionozis, benzalkonium klorid, nöronal plastisite

Summary

Questioning the Intestinal Aganglionosis Model by Using Benzalkonium Chloride

Aim: Aim of this study is questioning the validity of experimental aganglionosis producing procedure (EAPP) with benzalkonium chloride and reviewing the literature.

Material and Methods: Study was designed with 10 rats in each 3 group; as late period (LP-1), late period control group (LP-2) and early changes in aganglionosis (EP). Also effects of long segment aganglionosis procedure were observed in 4 rats. To evaluate anatomical changes, opaque enemas were done pre-and post operatively. Ganglion changes were evaluated histopathologically. Clinical findings were observed.

Results: LP-1 animals developed a functional obstruction clinic in early period but these findings resolved. There were no anatomical changes in opaque enemas except one animal. LP-1 animals lost weight during the procedure ($p<0.05$). Biopsy specimens showed normal cell count distribution, ganglion cells in LP-1. No clinical or histopathological changes were observed at control group of late period. In EP group, degeneration and decrease in ganglion cells were encountered. 4 animals which had a long segment aganglionosis procedure died due to massive ileus.

Conclusion: In our study, our findings did not correlate with previous supporting studies. Due to literature search, we think that this temporary aganglionosis clinic occurs by degeneration in ganglions in early period but by neuronal plasticity phenomena; new ganglions occur and the aganglionosis clinic resolves. Thus EAPP leads to temporary aganglionosis and can not be a real model of Hirschsprung disease.

Key words: Aganglionosis, benzalkonium chloride, neuronal plasticity

Giriş

Hirschsprung hastalığı (HH) doğumsal olarak bar-

saklarda ve özellikle kolonda ganglion hücrelerinin yokluğuna bağlı olarak fonksiyonel bir tıkanıklık gelişimi ile seyreden bir hastalıktır. Hastalık yenidoğan döneminde veya daha geç dönemde karın distansiyonu, defekasyonun olmaması veya uyarı ile olması gibi klinik ile ortaya çıkar (8).

Adres: Dr. Sinan Celayir, Şakacı Sok. Mehmet Sayman Apt. No:77, D:8, 34736, Kazasker, Kadıköy, İstanbul
Yayına kabul tarihi: 20.6.2006

HH'nin patogenezi anlamak için çeşitli tıkanıklık modelleri öne sürülmüştür. Önceleri distal kolon bağlanarak basit tıkanıklık modeli yapılmış ve HH benzeri klinik oluşturulmuştur. Fakat hastalığın sadece anatomik bir tıkanıklık olmadığı anlaşılmıştır. HH'da eşlik eden bağışıklık sistemi bozuklukları, barsak flora değişiklikleri, barsak musin oranlarındaki değişiklikler hastalığın sadece aganglionozise bağlı fonksiyonel bir tıkanıklık ile seyretmediğini göstermektedir (1,8).

1978'de A. Sato sıçanlarda kolon serozasına benzalkonium klorid (BK) uygulayarak HH'da olduğu gibi seçici olarak ganglion hücrelerinde dejenerasyon ve sonuçta aganglionozis geliştiğini gözlemledi (10). Sato çalışmasında nöronlarda dejenerasyonun erken dönemde başladığını ve BK uygulanan barsak parçasında tamamen aganglionozis gelişimini ise otuzuncu günde oluştuğunu saptadı. Sonraları bu model pek çok çalışmada kullanılmış ve hayvan modeli olarak da bildirilmiştir (1,4,5,7,10,12). Bununla beraber değişik zamanlarda yapılan birkaç çalışma modelin güvenilirliğini sorgulamamıza yol açmıştır (2,9).

Çalışmamızda Sato'nun deneysel aganglionozis modeli (DAM) sonrası aganglionozisin mikroskopik olarak görüldüğü otuzuncu günü de içeren sıçan gruplarında işlemin klinik ve histopatolojik değişiklikleri gözlemledik. Ayrıca literatürde başvurduğumuz diğer yayınları da göz önüne alarak ilk kırk sekiz saat içindeki değişiklikler erken dönem değişiklikler ve uzun segment aganglionozis işlemi yapılan 4 denek olarak ayrı bir grupta değerlendirdik (2,9,12).

Gereç ve Yöntem

Ağırlıkları 250-300 g arası 34 adet yetişkin erkek Sprague-Dawley sıçan çalışmada kullanıldı. Deneklere 50 mg/kg intramusküler ketamin HCL (Ketalar, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ile genel anestezi sağlandı. Sato'nun 1978'de tanımladığı gibi; % 0.1'lik BK solusyonu (Zefiran®, İlsan-İltas) 10 mm rektal, 5 mm distal sigmoid kolon serozasına bir bez ile uygulandı. Otuz dakika uygulama sonrası BK'lı bezler alınarak ılık serum fizyolojik ile barsaklar yıkandı. Çalışma için etik komite izni alındı. (Cerrahpaşa Tıp Fakültesi etik komitesi).

Geç dönem (GD-1) 10 deneye DAM uygulandıktan

sonra normal hayvan yemi ve su ile beslendi. Deneklerin ikisi 15. günde, ikisi 20. günde, altısı ise 30. günde dekapitasyon ile öldürüldü. Geç dönem kontrol (GD-2) 10 adet sıçana işlem yapılmaksızın hayvan yemi ve su verildi. Deneklerin ikisi 15. günde, ikisi 20. günde, altısı ise 30. günde öldürüldü. Deneklerin 15, 20 ve 30. günlerde öldürülmelerinin sebebi bu yazıda belirtilmeyen, çalışmanın kurulum aşamasında bazı sıçanlarda otuzuncu günü tamamlayamadan ölümler gelişmesi idi. Ara ölümlerin histopatolojik ve klinik açıdan değerlendirilmesine karar verildi ve çalışmada 15. ve 20. günlerde ölümler gerçekleştirilerek histopatolojik ve klinik inceleme yapıldı. Çalışmamızda erken grup oluşturulması ise çalışmanın kurulum aşamasında Sato'nun bulgularının aksine erken dönemde deneklerde aganglionozis kliniğinin daha belirgin olmasına rağmen histopatolojik değişikliklerin net olarak tanımlanmamış olması idi. Erken dönem çalışma olarak 10 adet erkek sıçanda BK'nun erken dönem histopatolojik değişiklikleri araştırıldı. Denekler ikişerli gruplar ile 1, 2, 12, 24 ve 48. saatlerde öldürüldü.

Ayrıca 4 adet sıçanda da 15 mm üzeri (25 mm) BK uygulandı. Bu uygulamanın sebebi de Sato orijinal çalışmasında uzun segment BK uyguladığı sıçanlarda erken dönemde ölüm ile sonuçlanan ileus geliştiğini saptaması idi. Biz de 15 mm den uzun segment aganglionozisin erken dönemde mortaliteye etkisini değerlendirdik ve tartışmaya açtık.

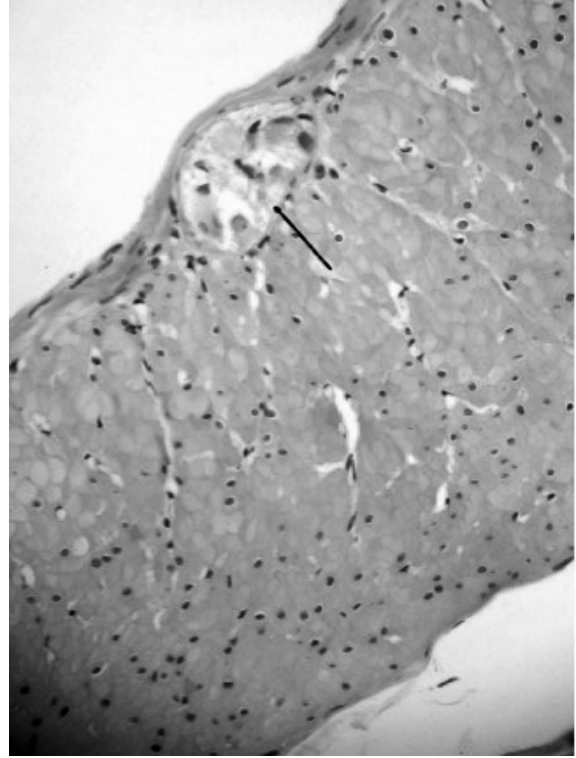
GD-1 ve GD-2 çalışma gruplarındaki deneklerin işlem öncesi ve sonrasında kiloları ölçüldü. Tüm gruplardaki deneklere kolon anatomik değişiklikleri işlem öncesi ve sonrasında sodyum diatrizoat (Urovison®-Schering) kullanılarak yapılan lavman opak grafiyle gözlemlendi. Patoloji örnekleri serum fizyolojik ile yıkandı ve % 10 formaldehit solusyonunda saklandı. Rutin doku prosedüründen sonra her bir patoloji örnekleri parafin bloklara alındı. Ano-rektumdan ve sigmoid kolondan 0.5 mikron kalınlıkta altmış adet kesit alındı ve kesitler hematoxilen-eozin ile boyandı. Işık mikroskopu ile değerlendirme yapıldı. Örneklerde dejenerasyon ve ganglion hücresi varlığı araştırıldı. Her iki gruptaki ağırlık değişiklikleri Mann-Whitney-U testi ile değerlendirildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

GD-1 deneklerde işlem sonrası ilk günlerde defekasyon miktarı azaldı, dışkı kalibrasyonu inceldi ve genel aktivitelerinde azalma izlendi. İzlemede genel durumu bozulan ve 15. günde öldürülen bir denek dışında tüm deneklerde birinci haftanın sonunda genel durumun kademeli olarak tamamen düzeldiği görüldü. Bu denek dışında tüm hayvanların postmortem laparatomisinde az derece yapışıklık dışında bulgu yoktu. Bu denekte ise distal dar barsak ve dilate proksimal kolonik barsak ile beraber geçiş bölgesinde küçük perforate bir alan saptandı. Ortalama kilo kaybı 16.7 g (+6, -116g) bulundu. Yine bu denek dışında tüm lavman opak grafipleri doğal idi (Resim 1). 15, 20 ve 30. günlerde öldürülen deneklerin histopatolojik incelemelerinde minimal dejenerasyon ile normal ganglion hücreleri varlığı saptandı (Resim 2). GD-2 denekler de 15, 20 ve 30. günlerde öldürüldüler. Deneklerde klinik bir değişim gözlenmedi. Ortalama kilo artışı +6.8 gr (+4, +10g) bulundu. Laparotomi bulguları ve lavman opak grafipleri doğal bulun-



Resim 1. İşlemin 30. gününde normal anatomik yapı gösteren lavman opak grafisi. Genel durumu bozuk olan 15. günde öldürülen dışındaki GD-1 ve 2 tüm deneklerin kolon grafisinde patoloji görülmedi.



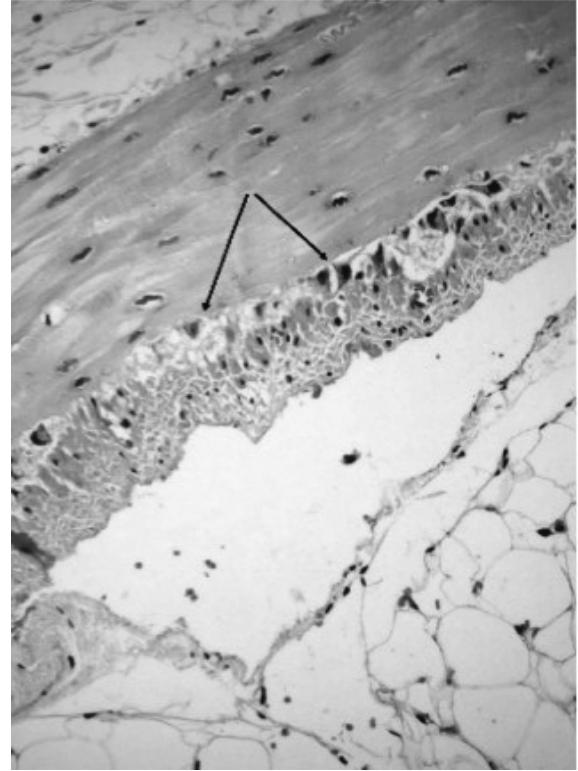
Resim 2. İşlemin 30. gününde ganglion hücreleri ile normal pleksus görülüyor (x200 HE).



Resim 3. Erken dönem grupta DAM uygulanmış 2. günde olan sıçan. Dilate ve dar kolonik segment gözükmektedir.



Resim 4. Resim 5 deki deneğin kolon yapısı. Resmin sağında dilate rektum ve dar ano-rektum görülüyor.



Resim 5. Tüm kesitlerde muskuler pleksusta ganglion hücreleri görüldü. Özellikle 24 ve 48. saatlerde dejenerasyon ve ganglion sayısı azlığı belirginleşti (x200 HE).

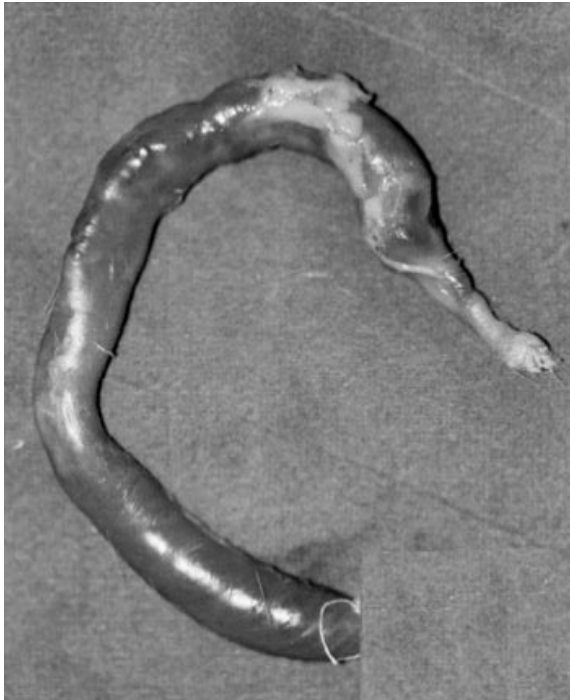
Tablo 1. Olgulara ait demografik veriler.

Gruplar n=34 (250-300 g)	İşlem	Beslenme	Klinik Takip	Öldürülme zamanları	Histopatoloji
GD-1 n=10	DAM (15 mm) Lavman opak grafi Ağırlık değişimi	Yem Su	Erken dönemde barsak tıkanıklığı Dışkı kalibrasyonunda azalma 1. hafta sonunda düzelme 1 deneğin kliniğinde bozulma Ort.: -16,7 g	15. gün (n=2) 20. gün (n=2) 30. gün (n=6)	Minimal dejenerasyon Normal ganglion hücresi
GD-2 n=10	Lavman opak grafi Ağırlık değişimi	Yem Su	Klinik değişme yok Ort.: +6,8 g	15. gün (n=2) 20. gün (n=2) 30. gün (n=6)	Normal ganglion hücresi
ED n=10	DAM (15 mm) Lavman opak grafi	Yem Su	Erken ameliyat sonrası bulgular, 24 ve 48 saat deneklerin lavman opak ve laparatomilerinde dilate proksimal dar distal segment	1. saat (n=2) 2. saat (n=2) 12. saat (n=2) 24. saat (n=2) 48. saat (n=2)	Ganglion sayılarında belirgin azalma ve dejenerasyon
Uzun Segment n=4	DAM (25 mm)	Yem Su	Erken ameliyat sonrası bulgular, Ağır barsak tıkanıklığı bulguları,	Denekler ilk 3 günde ileus ve perforasyon ile öldü.	Ganglion sayılarında belirgin azalma ve dejenerasyon, perforasyon

du. Ganglion hücreleri tüm deneklerde normal olarak bulundu. GD-1 ve GD-2 grupları arasında ağırlık değişiklikleri ileri derece anlamlı bulundu ($p<0.01$) (Tablo 1).

Erken dönem çalışma grubundaki 1, 2 ve 12. saatlerde eşit sayıda öldürülen toplam altı adet sıçanın laparotomi bulgusunda anatomik bir değişiklik görülmedi. 24. ve 48. saatlerde öldürülen dört deneğin kolonları ise dışkı ile dolu olduğu ve BK ile işlem gören bölümün dar olduğu saptandı (Resim 3, 4). Erken çalışma grubundaki on deneğin sitolojisinde ganglionlarda dejenerasyon ve ganglion sayılarında azalma saptandı (Resim 5). Fakat hiçbir denekte HH benzer histopatolojik yapı -aganglionozis- görülmedi (Tablo 1).

4 denekte yapılan 25 mm BK uygulamasında tüm denekler ilk 3 günde ağır ileus tablosu ile öldü. Deneklerin postmortem laparatomilerinde tüm kolonun dışkı ile dolu olduğu ve distalde dar kolon görüldü (Resim 6). 2 denekte ise ayrıca geçiş bölgesinde perforasyon saptandı.



Resim 6. 15 mm üzerinde BK uygulanan deneklerde ileri derece ileusa bağlı olarak ölüm gerçekleşti. Deneğin tüm kolonu sertleşmiş feçes ile dolu. Ganglionlar oluşumu gerçekleşse bile barsak peristaltizmi bu feçes engelini aşamamaktalar.

Tartışma

Deneysel aganglionozis oluşturulması modeli (DAM)'nin uzun yıllar geçerliliği savunulmuş bir metottur ve modelin geçerliliğine yönelik pek çok çalışma vardır (4,5,7,10,12). Sato'nun orijinal yazısında; ganglionlarda dejenerasyonun bulgusu olan hücrelerde vakuolizasyon ilk haftada belirlemekte ve belirgin dejenerasyon ve aganglionozis gelişimi ise belirgin olarak geç dönem sayılan işlemin otuzuncu gününde geliştiğini gözlemlemiştir (10). Sato'nun bu bulgusuna göre, tıkanıklık kliniği erken dönemde değil geç dönemde klinik vermelidir. Bu sonuç uzun segment aganglionozis işlemi yapılan sıçanlarda erken dönem ölüm görülmesiyle de çelişmektedir. Çünkü bu deneklerde de tıkanıklığa bağlı ölümün erken dönemde değil geç dönemde görülmesi beklenmelidir. Bu şüpheler üzerine çalışmamızda erken dönem ve uzun segment aganglionozis çalışma gruplarını oluşturduk. Amacımız gerçek dejenerasyonun erken dönemde olduğunu saptamak ve bu dejenerasyonun erken dönemde klinik bulgu verdiğini ve özellikle uzun segment aganglionozis işlemi yapılan deneklerde bu tıkanıklık kliniğinin ölümcül olduğunu ispatlamaktır.

Sonuç olarak Sato'nun bulgularının aksine, çalışmamızda nöron dejenerasyonunun beklediğimiz gibi erken dönem çalışma grubunda saptarken 15, 20 ve 30. günlerde öldürülen deneklerde belirgin olarak görülmedi.

Literatürde bulgularımıza benzer 3 çalışmaya rastladık. Ramalho yaptığı çalışmada BK'nın jejunumda ganglion hücrelerine olan etkisini iki dönemde inceledi. Erken dönemde (işlemin ilk saatlerinden onuncu güne kadar süre) ganglion sayısı, kronik dönem (10-60 gün) ile karşılaştırdığında daha az olduğunu saptadı. Ganglion sayısındaki geç dönemde olan bu artışı intestinal sistemde nöronal plastisite fenomenine bağlı olduğunu savunmuştur. Buna benzer bir çalışma da Garcia ve arkadaşları tarafınca yapılmış, BK uygulanan sıçanlarda 2 aylık bir sürecin sonunda ganglion sayıları kontrol grup ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark elde etmemiş ve bu sonucu nöronal plastisite fenomenine bağlı olduğunu öne sürmüştür (2,9).

Nöronal plastisite fenomeni diğer sistemlerde olduğu gibi intestinal sistemde de kök hücrelerin nörotropik faktörler eşliğinde yeni ganglion hücrelerine dönüşmesi ile gelişmektedir (3,11). Garcia ve Ramalho'nun çalışmaları intestinal sistemde nöronal plastisite fenomeninin varlığına ait çalışmalar olup hiçbirisinde Sato'nun modelinin geçerliliği sorgulanmamıştır.

BK ile en son çalışma Hanani tarafınca yapılmıştır. Hanani çalışmasında intestinal sistemde nöronal plastisiteyi araştırmış ve BK uyguladığı deneklerde geçici aganglionozis kliniği gözlemlemiştir. Hanani işlem sonrası deneklere ikinci gün yaptığı laparotomide dışkı ile dolu dilate proksimal kolon ve distalinde dar kolon gözlemlemiştir. Bu deneklerin sitolojisinde nöron ve nöronal liflerde dejenerasyon saptamış fakat aganglionozis görmemiştir. 30 ve 60. günde öldürülen deneklerde ise nöron sayısı kontrol gruba göre az olmakla beraber tüm kolonda varlığını saptamıştır. Hanani ilk defa Sato'nun modelinin geçerli olamayacağını bildirmiştir (6).

Çalışmamızda DAM uygulanan sıçanlarda erken dönemde gelişen klinik ve histopatolojik bulgular bu deneklerde bir sürecin başladığını gösterse de bu sürecin geç dönemde düzeldiği görüldü. Bu düzelmenin nöronal plastisiteye bağlı olarak, barsaktaki primitif hücrelerin yeni ganglion hücrelerine dönüşmesi ile olduğunu varsaymaktayız. Bulgularımıza göre deneklerde erken dönemde barsak hareketleri 15 mm gibi sınırlı tıkanıklık alanını tolere edebilirken, aganglionozis uzun segment olduğunda rejenerasyon gerçekleşse de ileri derece katılaşmış olan dışkınn barsak hareketleriyle ilerleyemediği ve kliniğin kötüleştiğini öngörmekteyiz.

Bütün bu modelin geçerliliğini sorgulayan bulgularımızla beraber şimdiye değin pek çok tıkanıklık modeli ile HH benzeri durum elde edilmeye çalışılrsa da eşlik eden bağışıklık sistem patolojileri, sendromlar, barsak flora değışiklikleri HH'nin sadece bir tıkanıklık modeli olmadığını göstermektedir.

Sonuç olarak; günümüze dek Sato'nun DAM modeli aganglionozis fizyopatolojisini anlamak ve oluşturmak için iyi bir model olarak savunulmuş olsa da çalışmamızda bu modelin güvenilirliğinin olmadığını öngörmekteyiz.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafınca desteklenmiştir.

Proje no: ÜDP- 376/26082004

Kaynaklar

1. Chang KS, Chang JHT: Animal models of pediatric surgical disease. *Ped Surg Int* 9:307, 1994
2. Garcia SB, Demarzo MM, Vinhadeli WS, Llorach-Veludo MA, Zoteli J, Herrero CF, Zucoloto S: No reduction with ageing of the number of myenteric neurons in benzalkonium chloride treated rats. *Neurosci Lett* 4:331-66, 2002
3. Georg B.T. von Boyen , Max Reinshagen , Martin Steinkamp , Guido Adler, Joachim Kirsch: Enteric nervous plasticity and development: dependence on neurotrophic factors. *J Gastroenterol* 37:583, 2002
4. Goto S, Gunter M, Grosfeld JL: Surgical treatment of total colonic aganglionosis: Efficacy of aganglionic patch enteroplasty in the rat. *J Pediatr Surg* 21:7-601, 1986
5. Goto S, Grosfeld JL: Is preserving the entire aganglionic colon reasonable in the surgical treatment of total colonic aganglionosis? *J Pediatr Surg* 22:623-627, 1987
6. Hanani M, Ledder O, Yutkin V, Abu-Dalu R, Huang T, Hartig W, Vannucchi M, Pellegrini M: Regeneration of myenteric plexus in the mouse colon after experimental denervation with benzalkonium chloride. *J Comp Neurology* 462:315, 2003
7. Mortell A, Montedonico S, Puri P. Animal models in pediatric surgery. *Pediatr Surg Int* 22:111-28, 2006
8. Puri P: Hirschsprung's disease: Clinical and experimental observations. *World J Surg* 17:374, 1993
9. Ramalho F.S, Santos L.N.Z: Myenteric neuron number after acute and chronic denervation of the proximal jejunum induced by benzalkonium chloride. *Neurosci Lett* 26:163, 74, 1993
10. Sato A, Yamamoto M, Imamura K, Kashiki Y, Kuniida T, Sakata K: Pathophysiology of aganglionic colon and anorectum: An experimental study on a aganglionosis produced by a new method in the rat. *J Pediatr Surg* 13:399, 1978
11. Timothy S. Sadiq, M.D., David A. Gerber: Stem Cells in Modern Medicine:Reality or Myth? *Journal of Surgical Research* 122:280, 2004
12. Yoneda A, Shima H, Nemeth L, Oue T, Puri P: Selective chemical ablation of the enteric plexus in mice. *Pediatr Surg Int* 18:234, 2002