

İnce bağırsak çıkarılmasında L-Argininin, bağırsağın uyumuna ve EGF salınımına etkileri: Sıçanlarda deneysel araştırma

Alpaslan ÇAMLI, Meral BARLAS, Ayşegül AKBAY

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi ve Biyokimya Anabilim Dalları, Ankara

Özet

Amaç: Çok miktarda ince bağırsak çıkarılmasında L-argininin (L-Arg), Epitelial Büyüme Faktörü (EGF) salınımına ve bağırsağın uyum sağlamasına etkili olup olmadığını araştırmaktır.

Yöntem: Araştırma Wistar cinsi Albino 250±40 g. ağırlığındaki 14 sıçanda yapıldı. Deneklere kas içi 50 mg/kg ketamin anestezisinden sonra % 50 ince bağırsak çıkarılması ve ağızlaştırılması yapıldı, yedişerli iki grup oluşturuldu. Deney grubuna çıkarma ve ağızlaştırmadan hemen sonra başlanarak, günde 500 mg/kg 14 gün periton içi L-Arg verildi. Kontrol grubuna çıkarma-ağızlaştırmadan başka bir işlem yapılmadı. Denekler günlük olarak tartıldı ve 14. gün ketamin anestezisinden sonra ikinci kez ameliyat edilerek Treitz bağı ile ileoçekal bileşke arasındaki bağırsaklar histopatolojik değerlendirme için alındı. Birinci ve 14. günlerde kan, tükürük ve idrarda EGF düzeyleri ELİSA yöntemi ile ölçüldü

Bulgular: L-Arg'nin ile tedavi edilen deney grubu ağırlığı (251±3.4 g), kontrol grubu ağırlığına (245±2.7 g) göre anlamlı olarak artmıştı (p<0.05). Deney grubu serum (7.83±0.2/4.83±0.6 ng/mL, p<0.05), tükürük (1.33±0.3/0.53±0.2 ng/mL, p<0.05), ve idrar EGF düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü (4.69±0.7/2.3±0.3 ng/mL, p<0.05). Ayrıca villus boyutları kontrol grubuna göre daha uzun olarak saptandı (708.4±29/590.6±5.1 mm, p<0.05).

Sonuç: Çok miktarda ince bağırsak çıkarılan sıçanlarda, periton içi uygulanan L-Arg'in, EGF düzeyinin artmasına ve bağırsağın uyum sağlamasına önemli derecede etkili olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Bağırsağın uyum sağlaması, EGF, L-arginin

Summary

The Effect of L-Arginine on endogenous epithelial growth factor (EGF) release and the intestinal adaptation in massive small bowel resection: experimental study in rats

Aim: The goal of this study is to investigate whether L-Arginine(L-Arg), has effect on endogenous EGF release and bowel adaptation in massive small bowel resection (SBR).

Method: Fourteen Wistar Albino rats weighing 250±40g were randomly selected and divided into two groups. Following 50 mg/kg IM ketamine anesthesia all rats underwent 50 % small bowel resection and anastomosis. Intraperitoneally 500 mg/kg/day of L- Arg was given to the experimental group for 14 days starting just after resection and anastomosis. Control group did not have any medication after small bowel resection and anastomosis. Weights of all rats were measured daily. At the end of the 14th day all rats underwent second laparotomy after ketamine anesthesia and their small bowels (from Trietz's ligament to ileocecal valve) were resected. Levels of EGF were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in serum, saliva, and urine on the 1st and 14th days in both groups.

Results: Comparison of study and control groups revealed increase in weight gain (251±3.4 v 245±2.7g, p<0.05), levels of EGF in serum (7.83±0.2 v 4.83±0.6ng / mL, p<0.05), and also an increase in saliva (1.33±0.3 v 0.53±0.2 ng/mL p<0.05), and urine (4.69±0.7 v 2.93±0.3 ng /mL, p<0.05), and increased small bowel villus length (708.4 ±29 v 590.6± 5.1mm p<0.05).

Conclusion: Rats with massive SBR, and treated by L-Arg, have increased endogenous EGF levels in serum, saliva, urine and enhanced villus length, body weight and intestinal adaptation.

Key words: Intestinal adaptation, Endogen EGF, L-arginine,

* V. MAPS Kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur (5-8 Haziran 2002 Çeşme, İzmir).

Adres: Dr. Meral Barlas, AÜTF Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Dikimevi 06100, Ankara
Yayına kabul tarihi: 22.12.2003

Giriş

Masif İnce bağırsak çıkarılması sonrası, azalan mukozal emilim ve sindirim kapasitesi kalan bağırsak

tarafından karşılanarak uyum sağlanmış olur. Halen çok miktarda bağırsak çıkarıldıktan sonra bağırsak uyumunu artırmak için çok sayıda cerrahi ve medikal tedavi söz konusu olmakla beraber çoğu güvenilir değildir ve klinik uygulamaya geçememiştir (1,2,13,18). Bağırsak uyumu kalan barsağın bütün katmanlarında hipertrofi, hiperplazi, bağırsağın boy ve ağırlığında, villus boyu ve kripta derinliğinde artma ile oluşur. Böylece emilim ve sindirim kapasitesi artar. EGF ilk olarak farelerin çene altı bezlerinde keşfedilmiş, 53 amino asit içeren 6 kD ağırlığında bir polipeptid zincirdir (3,12). Tükürük, duodenum salgısı, amniyotik sıvı ve insan sütünde yüksek yoğunluklarda bulunur (10,11,12). L-Arg ve diğer NO vericileri dokularda moleküler yapıları değişerek NO açığa çıkartan çoğu nitrit veya nitrat yapısında kimyasal maddelerdir (9).

Bu çalışmayla, çok miktarda ince bağırsak çıkarılan deneklerde, periton içi uygulanan L-Arg'in EGF düzeyi arttırımına ve bağırsak uyumuna etkili olup olmadığı araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırma Wistar cinsi Albino 250±40 g (Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü, Serum Çiftliği) ağırlığındaki 14 sıçanda yapıldı. Sıçanlar deney süresince kafeslerde, sıçan yemi ve şehir suyu ile serbest beslendi. Her biri yedişer adet olmak üzere iki grup oluşturuldu. Tüm denekler 12 saatlik açlıktan sonra 50 mg/kg kas içi ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ile uyutuldu. İki gün ampisilin sulbaktam 100 mg/kg kas içi verildi. Karın traşlanarak temizlendi. Steril olarak örtüldü orta çizgi kesisi ile karına girildi. Treitz bağından ileoçekal kapağa dek ortalama 80 cm'lik ince bağırsak parçasının % 50'si (ortalama 40 cm) çıkarıldı. Kalan bağırsak uçları 6/0 vicryl ile tek tek ve tek sıra dikişle ağızlaştırıldı. Bağırsak mezosu 5/0 vicryl ile onarıldı.

Karın ön duvarı 4/0 ipek ile kapatıldı. Ameliyat sonrası 24 saat aç bırakılan deneklere bu sürede üç kez sırt derisi altına 10'ar mL % 10 dekstroze ve % 0.9 sodyum klorür karışımı verildi. Deney gurubuna cerrahi girişimden hemen sonra başlanarak günde 500 mg/kg L-Arg. Periton içi olarak 14 gün boyunca uygulandı. Kontrol grubuna cerrahi girişimden sonra 14 gün boyunca hiçbir uygulama yapılmadı. Tüm denekler ameliyat sonrası 2. günde başlanarak normal

sıçan yemi ve şehir içme suyu ile beslendi.

Yapılan Araştırmalar:

1. Deneklerin her gün tartılması

2. EGF ölçümü(ELİSA) (5)

a-Kan 1 ml (ameliyat önce kuyruk veninden, sonrası kalpten)

b-Tükürük(kültür çubuğu pamuk ıslanana dek ağızda tutularak)

c-İdrar 1ml(Ameliyat öncesi ve sonrası idrar torbasından)

3. Bağırsakların histopatolojik değerlendirilmesi (H-E, Trichrom Masson)

Deneyde kullanılan L-Arg 25 g. Sigma Aldrich Chemical Co'dan ve EGF kiti Accucyte, Santa Cruz'dan (ABD) sağlandı. Toz halinde olan L-Arg 50 mg/mL olacak şekilde serum fizyolojik ile sulandırıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

Tükürük, kültür çubuklarının pamukları ağız içinde ıslanana dek tutularak alındı. Kan; ameliyat öncesi kuyruk veninden, deney sonu 14. gün ise denek öldürülmeden önce kalpten alındı. İdrar (0.5 mL) karın açılır açılmaz idrar torbasından enjektör ile alındı. Tüm örnekler -100°C'de saklandı ve EGF düzeyleri Grau'nun tanımladığı ELİSA yöntemi ile saptandı (5).

Mikroskopik değerlendirme: Birinci gün çıkarılan yaklaşık 40 cm'lik barsağın her iki ucundan, 14. gün çıkarılan bağırsaktaki ağızlaştırma çizgisinin 2 cm yukarı ve aşağısından barsağın uzun eksenine dik olarak, 5 mm genişliğinde halka kesitler şeklinde alınmıştır. Ölçümler Olympus BX40 mikroskopu ile x10'lik büyütme alanında, mercekle sayacı (oküler grid) kullanılarak, bir villusun en tepe noktası ile kriptanın muskularis mukozaya ulaşan en derin noktası arası ölçülerek yapılmıştır (5). Muskularis mukozanın başladığı noktanın saptanmasında Trichom Masson kesitlerden de yararlanılmıştır. Her bir örnekte 10 villus-kripta boyu ölçülmüş ve ortalaması alınmıştır. Tamamı net bir şekilde izlenmeyen villuslar değerlendirilmemiştir.

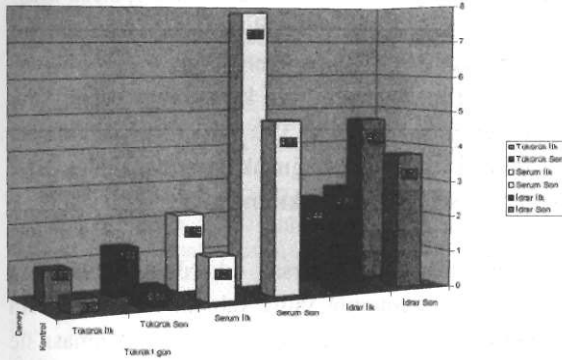
Kontrol ve deney grupları arası ağırlık, kan, tükürük, idrar EGF düzeyleri farklılıklarının istatistiksel analizi Mann-Whitney U ve Wilcoxon testleri ile yapılmıştır. Veriler ortalama±ortalamanın standart

hatası şeklinde verildi. Her iki yöntemde p değeri 0.05' den küçük olanlar anlamlı kabul edildi.

Çalışmalar için gerekli etik kurul kararı AÜTF' den alınmıştır.

Bulgular

Denekler cerrahi girişime iyi dayanmış olup yalnız bir denek kaybedilmiştir (% 93.3). Bağırsak çıkarıldıktan sonra sonra, L- Arg ile tedavi edilen sıçanlarda bağırsak uyumu 14. gün denek ağırlığının artması (6.4 ± 2.1 g p=0.001), villus boylarının daha uzun olmasıyla 708.4 ± 29 ve 590.6 ± 5.1 mm (p=0.018) izlenmiştir. Kontrol grubunda kilo kaybı 10 ± 2.4 g kadardır (p=0.001). Deney grubunda 14. gün villus uzunluklarının, kontrol grubundan daha uzun ve ağırlık kazanımının da artmış olması bağırsak çıkarıldıktan sonra L-Arg tedavisinin, bağırsağın uyum sağlamasına etkili bir madde olduğu şeklinde değer-



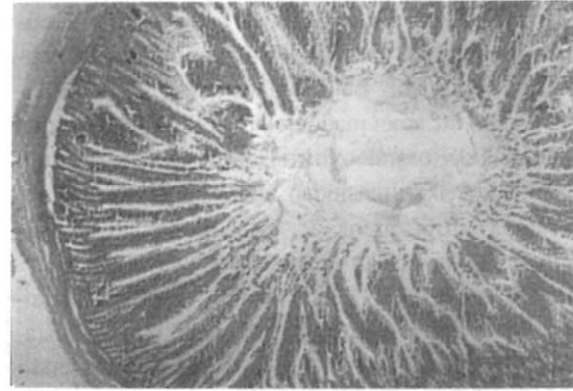
Grafik 1. Deney grubunda (arka sıra), kontrol grubuna (ön sıra) göre tükürük, serum, idrar EGF düzeylerinin daha yüksek olduğu görülmektedir (ng/ml).

Tablo 1. Deney ve kontrol grubu villus uzunlukları görülmektedir (mm).

Sıçan	Deney Grubu		Kontrol Grubu	
	1. Gün	14. Gün	1. Gün	14. Gün
1	474.0	658.5	558.5	609.0
2	503.0	663.5	580.0	603.0
3	572.0	732.5	570.0	601.5
4	475.5	730.5	555.0	578.5
5	469.0	590.0	550.5	582.5
6	533.0	758.5	351.5	585.0
7	426.5	825.0	596.0	575.0
Ortanca	493.9 ± 18	708.4 ± 29	537.4 ± 31	590.6 ± 5.1
p	p=0.001		p=0.001	



Resim 1. Kontrol grubunda (çok miktarda ince bağırsak çıkarılması ve yalnız ağızlaştırma) 14. günde, bağırsak kesiti ve villus uzunluğu görülmektedir (H-E,x40).



Resim 2. Deney grubunda (çok miktarda ince bağırsak çıkarılması ve ağızlaştırmadan sonra L-Arg verilen) 14. günde bağırsak kesiti ve villus uzunluğu görülmektedir (H-E,x40).

lendirilmiştir (Grafik 1, Tablo 1).

Kontrol ve deney gruplarındaki 14. gün serum EGF düzeyleri sırasıyla 4.83 ± 0.6 ve 7.83 ± 0.2 ng/mL (p=0.011), idrar EGF düzeyleri 2.93 ± 0.3 ve 4.69 ± 0.7 (p=0.007) iken tükürük EGF düzeylerinin 0.53 ± 0.2 ve 1.33 ± 0.3 (p=0.002) olduğu saptanmış ve her iki grup arası fark anlamlı bulunmuştur (Grafik 1).

Deney grubundaki 14. gün EGF düzeylerinin, kontrol grubundan daha yüksek olması, L-Arg'in serum, idrar ve tükürükte EGF'yi artırmakta etkili bir madde olduğunu düşündürmüştür. L-Arg ile tedavi edilen deney grubunda; villus boyunun 1. ile 14.gün arasında 493.9 ± 18 dan, 708.4 ± 29 mm ye kadar yükseldiği (p=0.001) (Resim 1,2), kontrol grubunda ise artışın 537.4 ± 31 dan 590.6 ± 5.1 mm gibi düşük düzeylerde olup istatistiksel yönden anlamlı olmadığı saptanmıştır (p=0.138).

Çok miktarda ince bağırsak kayıplarından sonra sıçanlarda, periton içi uygulanan L-Arg'in, EGF düzeyi artırımına (kan, idrar, tükürükte) ve bağırsak uyumuna (villus boyları, kilo kazanımı artması) önemli derecede olumlu etkili olduğu izlenmiştir.

Tartışma

Çok miktarda ince bağırsak çıkarılmasında bağırsak uyumu için çok sayıda cerrahi ve medikal tedavi sözü konusu olmakla beraber bu yöntemlerin sorunları çoktur ve güvenilir değildir. Çoğu klinik uygulamaya geçememiştir ve tartışmalar sürmektedir (1,2,13,18). Bu araştırmada, çok miktarda bağırsağın çıkarılmasından sonra sıçanlara, periton içi verilen L-Arg ile bağırsak uyumunun, tükürük ve serumda EGF üretiminin artmasıyla kanıtlandığı üzere olumlu etkilendiği gösterilmiştir. Bağırsakların uyum sağlamasında, önemli bir aracı madde olan ve tükürük bezinden salınan EGF başrol oynamaktadır. EGF miktarının bağırsağın çıkarılmasından sonra sonra tükürük ve serumda arttığı birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir, ancak bu artışın mekanizması yeteri kadar aydınlatılamamıştır (15). Androjenler, yaş, vazoaaktif intestinal peptid, tiroid hormonu, asetikolin ve histamin gibi çeşitli maddelerin EGF salınımında etkili olduğu bildirilmektedir (5,6,8,16). Ayrıca kimyasal ve mekanik özofagus uyarımı, periodontal hastalıklar, adrenerjik stress de EGF salınımını artırmaktadır (8,10-12).

Öte yandan EGF'nin en önemli üretim kaynağı olan tükürük bezinin çıkarılmasıyla bağırsak uyumunun bozulduğu da bilinmektedir (7).

Chaet ve Schwartz EGF'nin mukozal hiperplaziyi artırdığını saptayarak, çok miktarda bağırsak çıkarıldığında bağırsak uyumunu olumlu yönde etkilediğini göstermişlerdir. Ayrıca normal bağırsak mukozasına, EGF'nin eklenmesiyle bağırsağın ağırlığında, laktaz aktivitesinde ve net kalsiyum taşınmasında artma ve bakteri translokasyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (3,14). Fiore ve ark. ise, interlekin-11 ve EGF'nin ince bağırsak çıkarılmasından sonra, uyum sürecine olumlu etkilerde bulunduğunu saptamışlardır (4). Çalışmamızda çok miktarda ince bağırsak çıkarıldıktan sonra tedavi uygulanan ve uygulanmayan sıçanlarda 1. gün ile 14. gün arasında EGF'nin artmış olduğu saptanmıştır. Araştırmamızda her iki

grupta da EGF artış mekanizması kesin olarak bilinmemekle beraber, artışın çok miktarda bağırsağın çıkarılmasına bağlı stres ile oluştuğu düşünülebilir. Ancak 14 gün boyunca L-Arg ile tedavi edilen sıçanlarda EGF düzeyleri tedavi uygulanmayan gruba göre daha fazla artmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedavi grubundaki bu artış tamamıyla L-Arg ile oluşmuş bir artış olarak değerlendirilmiştir.

Tedavi edilen grupta 14. gün EGF düzeylerinin, kontrol grubundan daha yüksek olması, L-Arg'in serum, idrar ve tükürükte EGF'yi artırmakta etkili bir madde olduğunu göstermiştir.

Ayrıca tedavi edilen grupta sıçanların 6 g ağırlık kazanımı olmuş ve bağırsak villus uzunluğu artmıştır (p=0.018) (Resim 2). Bu veriler sıçanlarda periton içi uygulanan L-Arg'in, EGF düzeylerini serum, tükürük ve idrarda artırarak, EGF aracılığı ile bağırsak uyumunu olumlu yönde etkilediği şeklinde yorumlanabilir. Bulgular literatürle uyumludur, ancak araştırmacıların EGF'yi sistemik uygulamasına karşın çalışmamızda EGF, L-Arg verilmesiyle elde edilmiştir. L-Arg'in 8 şişelik bir kutusunun 50 milyon, EGF'nin bir şişesinin ise 350-400 milyon TL olması ve aradaki fiyat farkı, bağırsak uyumunda daha ucuz bir tedavi seçimini haklı kılmaktadır.

Çok miktarda ince bağırsak çıkarılmasından sonra bağırsağın uyumunun; villus tabanındaki hücrelerin çoğalması ve villus tepesine göçün hızlanması ile olduğu, böylece bağırsak çapında, uzunluğunda, villus boyutunda ve kripta derinliğinde artış, bağırsak duvarında kalınlaşma oluştuğu bildirilmektedir (3,6). Araştırmamızda villus boyutu ve kripta derinliğiyle birlikte denek ağırlıklarının da arttığı izlenmiştir. Deneklerin tümünde dışkıda şekil bozukluğu, sık ve sulu dışkılama (5-7/gün) olmuş; deney grubundaki dışkılama bulguları ilk hafta içinde düzelmiş ve 14. günde kısa süreli de olsa ishale karşın ortalama 6 g ağırlık kazancı olmuştur. Kontrol grubunda ise 10 g ağırlık kaybı saptanmıştır.

Sistemik olarak verilen EGF'nin dışında, vücutta salgılanan EGF'nin artırılmasının da bağırsak uyumuna olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir. Shin ve ark. ise çok miktarda ince bağırsak çıkardıkları sıçanlarda 3. gün salgılanan EGF'nin tükürük ve kanda arttığını, idrarda ise azaldığını bildirmişlerdir (15). Çalışma-

mızda 14. gün idrar EGF düzeylerinde de artış saptanmış ve bu fark zamanlama ile ilgili olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Ancak L-Arg tedavisi yapılan sıçanlarda, tedavi yapılmayan deneklere göre EGF düzeylerinin daha fazla arttığına saptanmış olması bağırsağı çıkarılan yapılan sıçanlarda, L-Arg'in EGF salınımını önemli derecede artırdığını kanıtlayan bir gösterge olmuştur.

Çok miktarda ince bağırsak kayıplarından sonra sıçanlarda, periton içi uygulanan L-Arg'in, salınan EGF düzeyi arttırımına ve bağırsak uyumuna önemli derecede olumlu etkide bulunduğu kanısına varılmıştır.

Teşekkür: Çalışmaya değerli katkıları nedeniyle AÜTF Biyoistatistik Anabilim dalından Dr. Attila Elhan ve Patoloji Anabilim Dalından Dr. Aylin Heper'e teşekkürü borç biliriz.

Kaynaklar

1. Barlas M, Gökçora İH, Ereku S, Dindar H, Yücesan S: Human amniotic membrane as intestinal patch for neomucosal growth in the rabbit model. *J Pediatr Surg* 27:597, 1992
2. Carlsson G, Hakanson A, Rubensson A, Finkel Y: Home parenteral nutrition (HPN) in children in Sweden. *Pediatric Nursing* 23:272, 1997
3. Chaet MS, Arya G, Ziegler MM, Warner BW: Epidermal growth factor enhances intestinal adaptation after massive small bowel resection. *J Pediatr Surg* 29:1035, 1994
4. Fiore NF, Ledniczy G, Liu Q, Orazi A, Du X, Williams DA, Grosfeld JL: Comparison of interleukin-11 and epidermal growth factor on residual small intestine after massive small bowel resection. *J Pediatr Surg* 33:24, 1998
5. Grau M, Rodriguez C, Soley M: Relationship between epidermal growth factor in mouse submandibular glands plasma, and bile: Effects of catecholamines and fasting. *Endocrinology* 135:1854, 1994
6. Helmrath MA, Shin CE, Erwin CR, Warner BW: Intestinal adaptation is enhanced by epidermal growth factor independent of increased ileal epidermal growth factor receptor expression. *J Pediatr Surg* 33:980, 1998
7. Helmrath MA, Shin CE, Fox JW, et al: Intestinal adaptation following small bowel resection is attenuated by sialoadenectomy. *Surgery* 13:59, 2000
8. Helmrath MA, Shin CE, Erwin CR, et al: Epidermal growth factor upregulates the expression of its own intestinal receptor following small bowel resection *J Pediatr Surg* 33:229, 1998
9. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 16:664, 1988
10. Hormia M, Thesleff I, Perheentupa J, et al: Increased rate of salivary epidermal growth factor secretion in patients with juvenile periodontitis. *Scand Jdent Res* 101:138, 1993
11. Li L, Yu Z, Piascik R, et al: Effect of esophageal intraluminal mechanical and chemical stressors on salivary epidermal growth factor in humans. *Am J Gastroenterol* 88:1749, 1993
12. Rall LB, Scott J, Bell GL, et al: Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature* 313:228, 1985
13. Saday C, Mir E: A surgical model to increase the intestinal absorptive surface: intestinal lengthening and growing neomucosa in the same approach. *J Surg Res* 62:184, 1996
14. Schwartz MZ, Kato Y, Yu D, Lukish JR: Growth-factor enhancement of compromised gut function following massive small-bowel resection. *Pediatr Surg Int* 16:174, 2000
15. Shin CE, Falcone RA, Duane KR, Erwin CR, Warner BW: The distribution of endogenous epidermal growth factor after small bowel resection suggests increased intestinal utilization during adaptation. *J Pediatr Surg* 34:22, 1999
16. Skow OP, Kirkegaard P, Poulsen SS, et al: Vasoactive intestinal polypeptide and acetylcholine stimulate exocrine secretion of epidermal growth factor from the rat submandibular gland. *Regul Pept* 15:37, 1986
17. Stern LE, Erwin CR, O'Brien DP, Huang FS, Warner BW: Serum from mice after small bowel resection enhances intestinal epithelial cell growth. *J Pediatr Surg* 36:184, 2001
18. Thompson JS, Rikkers LF: Surgical alternatives for the short bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 82:97, 1987