

Deneysel Bağırsak Hasarının Önlenmesinde Octreotid'in (SMS 201-995) Rolü

THE ROLE OF OCTREOTIDE (SMS 201-995) ON PREVENTING THE EXPERIMENTAL COLONIC DAMAGE

Abdulhalim BAKİ*, Yavuz TEKELİOĞLU**, Abdulkadir REİS***, Mehmet SARI****, Sait KAPICIOĞLU*****

* Yrd.Doç.Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Gastroenteroloji BD,
** Yrd.Doç.Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Histoloji AD,
*** Doç.Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Patoloji AD,
**** Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Gastroenteroloji BD,
***** Prof.Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Gastroenteroloji BD, TRABZON

Özet

İltihabi bağırsak hastalığı olan bireylerde, kontrol grupları ile kıyaslandığında somatostatin (SMS) içeren hücrelerin submukozal alanda azaldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada sıçanlarda asetik asitle oluşturulan bağırsak hasarında SMS analogu octreotid'in hücre düzeyinde etkileri araştırıldı. Çalışmada 20 erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar 24 saat aç bırakıldı ve 50 mg/kg pentobarbitalle i.p. anesteziye edildikten sonra 2 gruba ayrıldı. Grup 1: 50 µg/kg i.p. octreotide (Sandostatin ampul Novartis) rektal infüzyondan 1 saat önce sine kadar 8 saat arayla 3 defa verildi. Yumuşak bir kateterin anüsten itibaren 10 cm itilip 3 ml %5'lik asetik asitin verilmesi, arkasından hava verilmesi ile bağırsak hasarı oluşturuldu. Grup 2: Octreotid ile aynı volüm ve zamanda serum fizyolojik (SF) i.p. verildi. Sıçanlar bağırsak hasarı oluşturulduktan 4 saat sonra öldürüldü. Gruplar arasında makroskopik ve histolojik değerlendirmede anlamlı fark tespit edilmedi. Grupların "flowcytometric" analiz sonuçları: Grup 1(n:10) octreotid grubu; G1:60.72±3.70, S:30.4±2.06, G2:8.93±2.60, PI:0.39±0.03, Grup 2 (n:10) kontrol grubu; G1:74.4±2.16, S:16.77±1.64, G2:6.86±1.34, PI:0.23±0.02. Octreotid grubunda sentez fazı (S) ve proliferasyon indeksinin (PI) arttığı ($p<0.0001$, $p<0.0005$) G1 ve G2 fazlarının ise azaldığı gözlemlendi ($p<0.0004$, $p=0.019$). Bu çalışmadaki sonuçlar daha önceki literatür bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde SMS'in inflamasyona karşı koruyucu etkisi yanında erken dönemde ortaya çıkan tamir sürecini hızlandırdığı şeklinde yorumlanabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Somatostatin, Octerotid, Sıçan, Deneysel bağırsak hasarı

T Klin Gastroenterohepatol 2000, 11:36-39

Summary

In the individuals who have inflammatory bowel disease, it was observed that the numbers of cells containing somatostatin (SMS) decreased with compare to the control groups in the submucosal area. In this study the effects of octreotide, analogue of SMS, on the colitis that was produced by acetic acid in the rat was researched in the cell level. For this study, 20 male rat were used. The rats were not fed for 24 hours and after being anesthetised by 50 mg/kg pentobarbital, they were seperated into two groups. Group1: 50 mg/kg octreotide (Sandostatin flakon Novartis) was given t.i.d. until one hour before rectal infusion. The colonic damage was done by pushing a soft cateter 10 cm from the anus giving 3 ml 5% acetic acid, and air to the animals. Group2: Same amount of saline as octreotide was given at same intervals. Four hours after colonic damage was produced in the rats, they had been sacrificed. The pathologic and flowcytometric analysis was done in the colonic mucosa. There was no difference between two groups in both micro and macro levels. The flowcytometric results of Groups: Group1(n:10) octreotide group; G1:60.72±3.70, S:30.4±2.06, G2:8.93±2.60, PI:0.39±0.03, Grup 2(n:10) control group; G1:74.4±2.16, S:16.77±1.64, G2:6.86±1.34, PI:0.23±0.02. It was observed that the synthesis phase (S) and proliferation index (PI) increased ($p<0.0001$, $p<0.0005$) G1 and G2 phases decreased, in octreotide group ($p<0.0004$, $p=0.019$). When the results in this study were combined with the previous literature results, it was concluded that SMS increased the repairing process that occurred in the early periods, as well as protected against the inflammation.

Key Words: Experimental colonic damage, Rat, Somatostatin, Octreotide

T Klin J Gastroenterohepatol 2000, 11:36-39

Geliş Tarihi: 19.04.1999

Yazışma Adresi: Dr.Abdulhalim BAKİ
Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları AD,
Gastroenteroloji BD, 61080 TRABZON

İltihabi bağırsak hastalığı (İBH) patogenezinde rol alan glutamat ve nöropeptitler primer afferent nöronlarda sentez edilmekte ve salınmaktadırlar. Bu nöronlar periferik dokularda inflamatuvar ve immün cevabın regülasyonunda rol oynarlar. Bu

nörotransmitterler kolesistokinin, somatostatin (SMS), substans P ve vazoaaktif intestinal polipeptid (VIP)'dir. Yapılan çalışmalar İBH olan bireylerde submukozal alanda kontrol grupları ile kıyaslandığında SMS içeren hücrelerin azaldığını göstermiştir (1). Son zamanlarda octreotid ve diğer somatostatin analoglarının inflamatuvar süreci sitokinleri modifiye ederek azalttıkları gösterilmiştir. Octreotid TNF-alfa regülasyonunu sağlayarak antiinflamatuvar etkinliğini göstermektedir (2). Asetik asitle oluşturulan deneysel kolitte mukozal platelet aktive eden faktör (PAF), lökotrien B4 (LB4) sentezinin arttığı ve somatostatin düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. Octreotid uygulamasından sonra PAF, LB4, VIP düzeylerinin azaldığı lökotrien C4 (LC4) ve kalsitonin gen ilişkili peptid (CGRP) düzeylerinin değişmediği, bağırsak hasarının düzeldiği gösterilmiştir (3). Bu sonuçlar mukozal SMS'in azalmasının İBH patogenezinde rol alabileceğini ve bu peptidin dışardan verilmesi ile mukozal hasarın düzelebileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada sıçanlarda asetik asitle oluşturulan deneysel bağırsak hasarında SMS analogu octreotid' in hücresele düzeyde etkileri araştırıldı.

Materyel ve Metod

Çalışma için 200-250 g ağırlığında 20 erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar sadece su içmelerine izin verilerek 24 saat aç bırakıldı ve 50 mg/kg pentobarbitalle intraperitoneal (i.p.) anesteziye edildikten sonra 2 gruba ayrıldı. Grup 1: 50 µg/kg i.p. octreotide (Sandostatin ampul Novartis) rektal infüzyondan 1 saat öncesine kadar 8 saat arayla 3 defa verildi. Yumuşak bir kateterin anüsten 10 cm itilip 3 ml %5'lik asetik asitin verilmesi, arkasından hava verilmesi ile deneysel bağırsak hasarı oluşturuldu. Grup 2: Octreotide ile aynı volüm ve zamanda serum fizyolojik (SF) i.p. verildi. Sıçanlar bağırsak hasarı oluşturulduktan 4 saat sonra öldürüldü. Kolonları histolojik ve "flowcytometric" analiz için çıkarılıp % 10'luk formalinde saklandı.

Makroskopik ve mikroskopik değerlendirme: Anüsten itibaren 4 cm'lik bağırsak segmentinde oluşan lezyon sayısı değerlendirildi. Bu dokudan alınan 2 cm'lik bir kesit %10 formalin içinde patoloji laboratuvarına gönderildi. Rutin takip aş-

malarından sonra Hematoksilen Eosin ile boyanıp x100 büyütme ile iki ayrı histopatolog tarafından değerlendirildi ve birbirini takip eden 6 ayrı alanda mukozal, submukozal lezyonların derinlik ve genişliği değerlendirildi.

Proliferatif aktivitenin "flowcytometry" ile ölçümü: Taze doku içinde medium (RPIM-1640 + %5 fetal calf serum) bulunan plastik petri kutusunda 4°C'de mekanik olarak parçalandı. Bu prosedürden sonra suspansiyon 80µ boyutlu porları olan filtreden süzüldü ve içinde % 0.1 triton x-100 PBS bulunan buzda 3 dakika bekletildi. Sonra yıkandı ve 37°C'de 20 dakika RNA'z ile inkübe edildi (180 U/mL PBS içinde). Yıkama periyodundan sonra hücre suspansiyonu propidiumiodide ile (50 µg/ml PBS) 1 saat 4°C'de karanlıkta bekletildi ve "flowcytometric" analiz yapıldı. "Flowcytometric" analiz (FCA) Epics Elite EST (Coulter-USA) "flowcytometry" ile yapıldı. Hücrelerin G1, S, G2 fazları Multi Cycle DNA bilgisayar programı (Phoenix flow systems, Inc. San Diego) ile hesaplandı. Bu değerler proliferatif-rejeneratif indeks olarak yorumlandı (PI). PI; S fazı G2/M fazı toplamının G0/G1,S,G2/M toplamına bölümünün yüzde fraksiyonu olarak ifade edildi (4,5).

Sonuçlar ortalama ± SD olarak ifade edildi. İstatistiksel analiz Student t ile yapıldı ve p<0.05 anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Makroskopik değerlendirmede kolon mukoza-sında yer yer hiperemi dışında patoloji tespit edilmedi. Mikroskopik değerlendirmede submukozal damarlar çevresinde minimal iltihabi hücre infiltrasyonu mevcuttu. Gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi. Grupların "flowcytometric" analiz sonuçları: Grup 1 (n:10) octreotid grubu; G1:60.72±3.70, S:30.4±2.06, G2:8.93±2.60, PI:0.39±0.03, Grup 2 (n:10) kontrol grubu; G1:74.4±2.16, S:16.77±1.64, G2:6.86±1.34, PI:0.23±0.02. Octreotid grubunda sentez fazı (S) ve proliferasyon indeksinin (PI) arttığı (p<0.0001, p<0.0005) G1 ve G2 fazlarının ise azaldığı gözlemlendi (p<0.0004, p=0.019) (Tablo 1).

Tartışma

İltihabi bağırsak hastalıklarında (İBH) son yıllarda özellikle enteral sinir sistemi, nöropeptitler

Tablo 1. Deneysel bağırsak hasarında octreotid ve "flowcytometry" ilişkisi

Gruplar	Hücre siklusu			
	G1 fazı	S fazı	G2 fazı	PI
Kontrol (%)	74.4 ± 2.16	16.77 ± 1.64	6.86 ± 1.34	0.23 ± 0.02
Octreotid (%)	60.72 ± 3.70 *	30.40 ± 2.06**	8.93 ± 2.60***	0.39 ± 0.03****

*p< 0.0004, **p< 0.0001, ***p= 0.019, ****p< 0.0005

ve mukozal immünitadaki değişikliklerin iltihabi cevabın oluşmasında önemli rollerinin olduğu ve aralarındaki ilişkinin iltihabi cevabın şiddetini belirlediği vurgulanmaktadır (6-10,11). Hastalığıdaki iltihabi değişikliklerin aktive olmuş immün sistem hücrelerinden kimyasal mediatörler, süperoksit radikalleri, PAF, LTB4, LTC4, tromboksan ve PGE2 salınımı sonucu oluştuğu ve remisyona birlikte bu maddelerin normale döndüğü bilinmektedir (11,12).

Bu çalışmada octreotid koruyuculuğunda asetik asitle oluşturulan deneysel bağırsak hasarında makroskopik ve mikroskopik değişikliklerin erken dönemde ortaya çıkmadığı oysa moleküler düzeyde hücrede sentez fazı ve proliferasyon indeksinde anlamlı artış olduğu gözlenmiştir.

Somatostatinin İBH patogenezindeki rolü açık değildir. Yapılan çalışmalarda enterik nöropeptidlerin mukozal immünitinin modülasyonunda önemli rol oynadığı anlaşılmıştır. Ortaya çıkan ödem ve düz kas kontraksiyonunda enterik nöronal fonksiyon değişiklikleri ve nöropeptidlerin konsantrasyonlarındaki değişikliklerin rol aldığı düşünülmektedir (7,13,14). İltihabi bağırsak hastalıklarında rektal VIP ve substans P, beta-endorfin, tyrotropin-releasing hormonun arttığı saptanmıştır (1,9,15,16). Bu nöropeptidlerin artması yanında aktif ülseratif kolitli hastalarda kolondaki submukozal SMS içeren hücrelerin azaldığı, hastalığın iyileşmesi ile hücre sayılarının normale döndüğü ve salgılanan SMS düzeyinin normale döndüğü gözlenmiştir (3,6,16,17). SMS salgılayan hücrelerdeki azalmadan kript abseleri sorumlu olabilir (18). Fakat kript absesi olmayan alanlarda da bu hücrelerde azalma mevcuttur (6,11). SMS'in bağırsak mukozasındaki koruyucu etkisi c-AMP'nin inhibisyonu ve kalsiyum artışının blokajı şeklinde iki farklı mekanizma ile açıklanmaya çalışılmıştır (6). SMS Peyer plaklarındaki lenfositlerin çoğalmasında ve immünglobulin sentezini, T lenfositlerin çoğal-

masını ve bu hücrelerden sitokinlerin salınımını engeller (19). Deneysel kolitte LTB4, PGE2, PAF miktarları artarken, SMS düzeylerinin düştüğü oysa SMS koruyuculuğu altında oluşturulan kolitte bu nöropeptidlerin düzeylerinin anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir.(3) İBH'nda mukozal SMS konsantrasyonlarındaki değişme bu peptidin azalmasının, hastalığın fizyopatolojisinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir (20). SMS İBH'nda koruyucu rol oynamaktadır (21). SMS'nin azalması iltihabı başlatan bir neden olmaktan çok olayı şiddetlendiren bir nedendir (6,22). Önceki çalışmalarda SMS analogu octreotidin koruyuculuğunda oluşturulan deneysel kolitte kontrol ile karşılaştırıldığında tedavi gruplarında hastalığın aktivitesini gösteren parametrelerde (ishal, kanama, vaskülit) belirgin azalma görülmüş ve bu grupta LTB4, PGE2, PAF düzeylerinde de azalma saptanmıştır (3,23).

Bu çalışmadaki sonuçlar daha önceki literatür bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde SMS'in inflamasyona karşı koruyucu etkisi yanında erken dönemde ortaya çıkan tamir sürecini hızlandırdığı şeklinde yorumlanabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Mayer EA, Raybould H, Koelbel C. Neuropeptides inflammation and motility. Dig Dis Sci 1988;136:152-6.
2. Lamrani A, Tulliez M, Chauvelot-Moachon L, Chaussade S, Mauprivez C, Hagnere AM, Vidon N. Effect of octreotide treatment on early TNF-alpha production and localization in experimental chronic colitis. Aliment Pharmacol Ther 1999;13:583-94.
3. Elikaim R, Karmeli F, Okon E, Rachmilewitz D. Octreotide effectively decreases mucosal damage in experimental colitis. Gut 1993;34:264-9.
4. Bauer KD. DNA and nuclear antigen analysis of tissue specimens. 1987 Annual Course in Flow Cytometry, Applications in immunobiology and cell biology. Los Alamos NM, National Flow Cytometry Resource and Smith Kline and French Laboratories 1987.

5. Riley RS, Mahin EJ, Ross W. DNA ploidy and cell cycle analysis, in *Clinical Applications of Flow Cytometry*, Eds Riley RS, Mahin RJ, Ross W. Igaku-Shoin New York-Tokyo, 1993: 251-322.
6. Vatanabe T, Kuboto Y, Sawada T, Muto T. Distribution and quantification of somatostatin in inflammatory diseases. *Dis Colon Rectum* 1992; 35: 488-94.
7. Debas HT, Mulvihill SJ. Neuroendocrine design of the gut. *Am Surg* 1991; 161:239-43.
8. O'Dorisio MS. Neuropeptides and gastrointestinal immunity. *Am J Med* 1986; 81:74-82.
9. Staniz AM, Befus D, Bienenstock J. 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.
10. Donatson MR, Cello J, Schneiderman D. Inflammatory bowel diseases In: Sleisenger MH, Fordtran JS, eds. *Gastrointestinal Diseases*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1988: 1327-477.
11. Jagaarhi V. Current concepts of the etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1991; 86(11):1566-72.
12. Fiocchi C. Interleukin- 2 activity of human intestinal mucosa mononuclear cells. Decreased level in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1984; 86:734-42.
13. O'morain C, Bishop AE, McGregor GP, Levi AJ, Bloom SR, Polak JM. Vasoactive intestinal peptide concentrations and immunocytochemical studies in rectal biopsies from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1984; 25:57-61.
14. Koch TR, Carney JA, Go VLW. Distribution and quantification of gut neuropeptides in normal intestine and inflammatory bowel diseases. *Dig Dis Sci* 1987; 32:369-76.
15. Mantyh PW, Cattton MD, Boehmer CG, Welton ML, Passaro EP Jr, Vigna SR. Receptors for sensory neuropeptides in human inflammatory diseases: implications for the effector role of sensory neurons. *Peptides* 1989; 10:627-45.
16. Yamamoto H, Mitsuma T, Nagura H. Abnormal neuropeptide concentration in rectal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 1996; 31:525-32.
17. Koch TR, Carney JA, Morris VA, Go VLW. Somatostatin in the idiopathic inflammatory bowel diseases. *Dis Colon Rectum* 1988; 31:189-203.
18. Ponder BA, Schimdt GH, Wilkinson MM, Wood WJ, Monk M, Reid A. Derivation of mouse intestinal crypts from single progenitor cells. *Nature* 1985; 313:689-91.
19. Dharmathaphorn K, Sherwin RS, Dobbins JW. Somatostatin inhibits fluid secretion in the rat jejunum. *Gastroenterology* 1980; 78:1554-8.
20. Reubi JC, Mazzucchelli L, Laissue JA. Intestinal vessels express a high density of somatostatin receptors in human. *Gastroenterology* 1994; 106: 951-9.
21. Payer J, Huorka M, Duris I, Mikulecky M, Keratochvilova H, Ondrejka P, Lukac L. Plasma somatostatin levels in ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 1994; 41:552-3.
22. Mantyh PW, Cattton M, MAggio JE, Vigna SR. Alterations in receptors for sensory neuropeptides in human inflammatory bowel diseases. *Adv Exp Med Biol* 1991; 298:253-83.
23. Dobrucalı A, Altın M, Tuncer M, Sander E, Göksel S, Savlı H. Sıçanlarda asetik asitle oluşturulan deneysel kolitte sandostatinin koruyucu etkisi. *T J Gastroenterology* 1993; 4:323-6.