

# Ratlarda sol kolon greftinde eritropoetin'in iskemi üzerine koruyucu etkileri

Erdal Türk (\*), İrfan Karaca (\*), Aytaç Karkiner (\*), Hüseyin Evciler (\*), Ragıp Ortaç (\*\*), Günyüz Temir (\*), Başak Uçan (\*), Derya Yayla (\*)

## ÖZET

Ösefagusun geriye dönüşsüz bir şekilde hasar görerek pasajı engellediği durumlarda, ösefagus replasmanı amacıyla mide, jejunum, ileum ve kolon segmentleri kullanılabilir. Bu tekniklerden kolon interpozisyonu en sık tercih edilen yöntemdir. Greftlerin kullanıldığı tüm diğer cerrahi yöntemler gibi ösefagus replasmanı amaçlı kullanılan kolon greftlerinde de reperfüzyon hasarı belirli oranda gelişmektedir. Eritropoetin hormonunun iskemi/reperfüzyonda dokuyu koruyucu bir etki gösterebileceği bilinmektedir. Bu çalışmada ratlarda, sol kolon grefti oluşturulduktan sonra greftin uç kısımlarında meydana gelen mukozal hücrelerdeki iskemik değişiklikler ile intraperitoneal eritropoetin uygulamasının bu değişiklikler üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Toplam 56 denek rastgele Sham (n=14), Sham+eritropoetin (n=14), kolon grefti (n=14), kolon grefti+eritropoetin (n=14) olmak üzere dört ana gruba, her grup da kendi içinde 2 alt gruba ayrıldı. Birinci alt gruba 1 gün sonra, 2. alt gruba ise 7 gün sonra reoperasyon sonrası histopatolojik inceleme yapıldı. Kolon grefti ve kolon grefti+eritropoetin grupları arasında postoperatif 1. gün ve 7. gün proksimal uçlarının değerlendirilmesinde mukozal hasarın kolon grefti grubunda anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü. Bu çalışma, preoperatif intraperitoneal eritropoetin uygulamasının, kolon grefti hazırlanmış ratlarda mukozal hasarlanmayı belirgin olarak azalttığını göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Eritropoetin, iskemi/reperfüzyon hasarı, kolon grefti, kolon interpozisyon

## SUMMARY

**The protective effects of erythropoietin on ischemia in the left colonic graft in rats**

Segments from the stomach, jejunum, ileum and colon may be used for esophageal replacement when irreversible injury of the esophagus prevents passage. Of these techniques colon interposition is the most preferred method. Reperfusion damage develops at a certain rate in colon grafts used for esophageal replacement as with all other surgical methods where grafts are used. It is known that erythropoietin hormone may have a tissue-protective effect in ischemia/reperfusion. Ischemic changes developing in mucosal cells in the graft ends after creating a left colon graft in rats and the effect of intraperitoneal erythropoietin administration on these changes were investigated in the present study. A total of 56 subjects were randomly divided into four main groups of Sham (n=14), Sham+erythropoietin (n=14), colon graft (n=14) and colon graft+erythropoietin (n=14), and each group was divided into 2 subgroups. Histopathological examination was performed to the first subgroup one day and to the second subgroup 7 days after reoperation. There was significantly more mucosal damage in the colon graft group in comparison to the postoperative day 1 and 7 proximal ends between the colon graft and colon graft+erythropoietin groups. Results of the present study showed that intraperitoneal erythropoietin administration significantly decreased mucosal damage in rats in which a colon graft was prepared.

**Key words:** Erythropoietin, ischemia/reperfusion injury, colonic graft, colon interposition

\* Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Cerrahisi Kliniği

\*\* Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü

Bu çalışma 7. Avrupa Çocuk Cerrahisi Kongresinde (10-13 Mayıs 2006, Maastricht, Hollanda) ve 24. Ulusal Çocuk Cerrahi Kongresinde (4-8 Kasım 2006, Adana) sunulmuştur

**Ayrı basım isteği:** Dr. Erdal Türk, Güzelyalı Mah. Bülent Ecevit Bulvarı No:68/8, 52100, Ordu

**E-mail:** eturk19@yahoo.de

**Makalenin geliş tarihi:** 05.09.2008 • **Kabul tarihi:** 21.10.2008

## Giriş

Uzun aralıklı ösefagus atrezisi, ciddi peptik ve kostik darlıklar gibi ösefagusun geriye dönüşsüz hasar görek pasajının engellendiği durumlarda, ösefagus replasmanı amacıyla mide, jejunum, ileum ve kolon segmentleri kullanılabilir. Bu tekniklerden kolon interpozisyonu en sık tercih edilen yöntemdir (1).

Kolon interpozisyonu tekniğinde; çıkan kolon, inen kolon ve ileokolik segmentler kullanılabilir. İnen kolon en sık kullanılan segmenttir (1,2). İnen kolonun beslenmesi sol kolik arterin çıkan dalı ile sağlanmaktadır. Cerrahi işlem esnasında sol kolik arter ve dallarında oluşabilecek hasarlar distal ve proksimal greft uçlarında darlık ve kaçak gibi ciddi problemlerle sonuçlanabilir (3). Bu iskemik hasarların üstesinden gelmek için çeşitli cerrahi teknikler geliştirilmiş olmasına rağmen, anastomoz kaçakları ve ciddi anastomoz darlıkları halen klinik olarak önemi korumaktadır (4).

Greftlerin kullanıldığı tüm diğer cerrahi yöntemler gibi ösefagus replasmanı amaçlı kullanılan kolon greftlerinde de reperfüzyon hasarı belirli oranda gelişmektedir. Reperfüzyon hasarı, geçici bir barsak iskemisi döneminden sonra ortaya çıkmakta ve iskeminin neden olduğu doku hasarını şiddetlendirmektedir (5,6).

İskemik intestinal hasarlanmayı önlemek amaçlı birçok ajan deneysel olarak kullanılmış olmasına rağmen, klinik etkinliği ortaya konmuş bir ajan saptanamamıştır. Eritropoetin (EPO) böbreklerden hipoksiye yanıt olarak salınan ve hematopoietik sistemi uyaran glikoprotein yapıda bir hormondur (7,8). EPO reseptörlerinin varlığı eritroid progenitor hücrelerde, endotelial hücrelerde, nöronlarda, kardiyomiyositlerde ve enterositlerde gösterilmiştir (9). Yapılan son araştırmalarda bu hormonun iskemi/reperfüzyonda (İ/R) dokuyu koruyucu bir etki gösterebileceği belirtilmektedir (10).

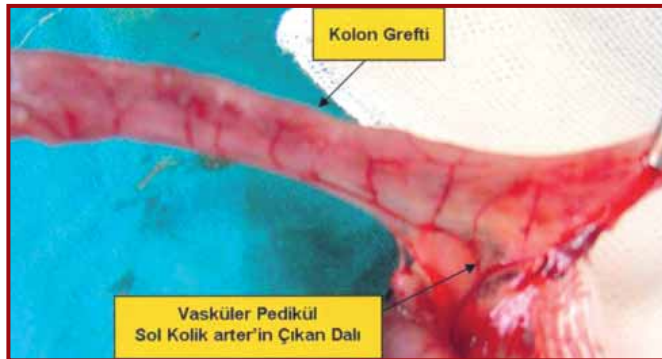
Bu çalışmada, ratlarda sol kolik arterin çıkan dalı ile beslenen sol kolon grefti hazırlandıktan sonra bu greftin proksimal ve distal uçlarında meydana gelen mukozal iskemik değişiklikler ve bu hasarların önlenmesinde EPO'nin etkinliği araştırılmıştır.

### Gereç ve Yöntem

Bu çalışma için gerekli etik kurul izinleri alındıktan sonra vücut ağırlıkları 175–220 gr arasında olan Wistar-Albino türü erkek erişkin ratlar, %40'lık nem oranına ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüsüne sahip, 24 °C ısıda olan bir odada tutuldu. Hayvanlar standart pellet yem ile beslenerek, operasyondan 12 saat önce aç bırakıldı. Toplam 56 denek rastgele Sham (S, n=14), Sham+EPO (SE, n=14), kolon grefti (KG, n=14), kolon grefti+EPO (KGE, n=14) olmak üzere dört ana gruba, her grup da kendi içinde 2 alt gruba ayrıldı. Birinci alt gruba 1 gün sonra, 2. alt gruba ise 7 gün sonra reoperasyon sonrası histopatolojik inceleme yapıldı.

Ratlara, 100 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye)+5 mg/kg Xylazine® (Rhompun, Abdi İbrahim, İstanbul, Türkiye) ile intramüsküler anestezi uygulandı. SE grubu ve KGE grubundaki deney hayvanlarına operasyondan hemen önce 750 İÜ/kg intraperitoneal tek doz olarak EPO uygulandı. Operasyon sonrası dehidratasyonu önlemek için 50 ml/kg %0.9 NaCl solüsyonu intraperitoneal olarak uygulandı.

S ve SE gruplarındaki deneklerde batın, 5 cm'lik orta hat insizyon ile açılıp, tüm ince barsaklar ve kolon insizyondan dışarı çıkarıldı. Beş dakika beklenip tekrar batın içerisine gönderildi. KG ve KGE gruplarında ise sol kolik arterin inen dalı ve orta kolik arterin sol dalı bağlandıktan sonra kesildi. Bu alanlardan vasküler arkadlar korunarak kolon transekte edildi. Sol kolik arterin çıkan dalı ile beslenen yaklaşık 5 cm uzunluğundaki transvers-sol inen kolon grefti, distal ve proksimal uçlarının grefti besleyen damara olan uzaklığının oranı yaklaşık ¼ olacak şekilde hazırlandı (Şekil 1). Barsak bütünlüğü uç uca kolokolik



Şekil 1. Hazırlanmış bir kolon grefti

anastomoz ile sağlandı. Pediküllü kolonik segmentin distal ve proksimal ucu 5/0 ipekle sütüre edilerek kapatıldı. Graft proksimal ucundan periton ön duvarına 5/0 ipekle pedikül gergin olacak şekilde tespitlendi.

Hayvanlar operasyondan 24 saat sonra yüksek enerjili lifsiz besin ile (Biosorb®, Nutricia, Zoetermeer, Hollanda) beslenmeye başlandı. Postoperatif 3. günden itibaren ise standart pellet yem ile beslenmeye devam edildi.

Operasyondan 1 gün sonra tüm grupların 1. alt grubu (n=7), 7 gün sonra ise 2. alt grubu (n=7) tekrar operasyona alınarak hazırlanmış kolon greftleri rezeke edildikten sonra antimezenterik yüzden longitudinal eksende açıldı, proksimal uç 5/0 ipekle işaretlendi ve örnekler %4'lük tamponlu formalin içerisinde 24 saat bekletilerek tespit edildi. Bu materyallerden greft boyunca longitudinal eksene paralel örnekler elde edilerek rutin doku işlemine alındı ve parafin bloklar hazırlandı. Kesitler hematoksilin-eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda 10x18/L büyütme okülerle değerlendirildi. Proksimal ve distal uçlarda 1 cm uzunluktaki intestinal segmentte skorlama yapılarak, mukozadaki iskemik değişiklikler ve pleksuslardaki gangliyon hücrelerinin durumu değerlendirildi. Mukozal değişikliklerin değerlendirilmesi, Leung ve ark. tarafından tanımlanan aşağıdaki skorlama sistemi kullanılarak yapıldı (11).

0. Normal mukoza

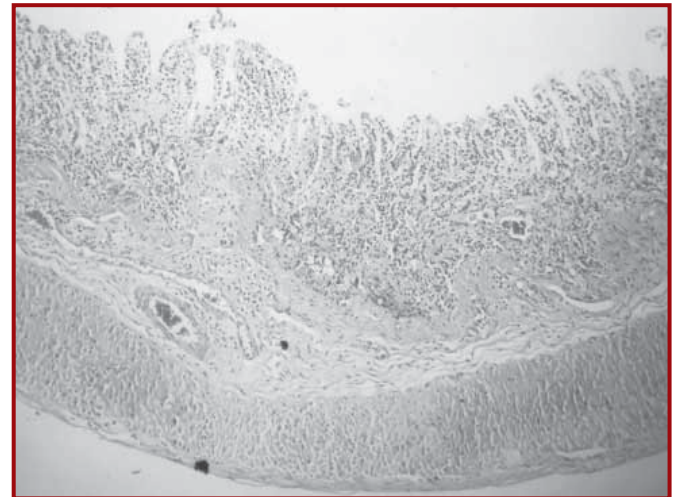
1. Yalnızca yüzeysel epitel hasarı

2. Mukozanın hasar görmüş üst yarı epiteli

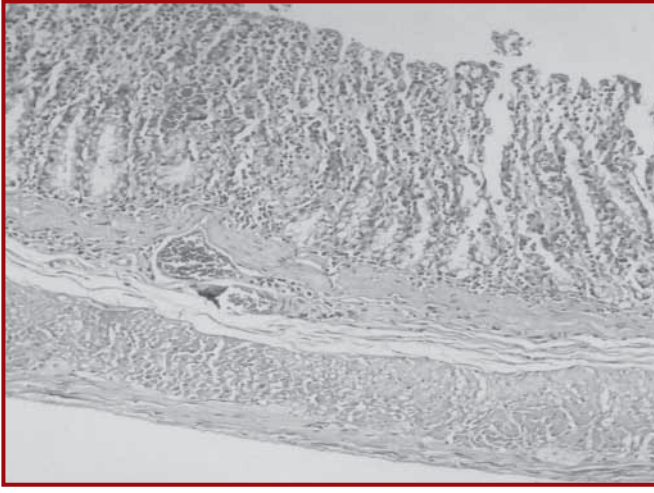
3. Büyük miktarda hasar görmüş mukoza epiteli, fakat bu hasar bezlerin tabanına ulaşmamıştır (Şekil 2)

4. Tüm mukozanın harabiyeti (Şekil 3)

Gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel anlamlılık açısından değerlendirilmesinde, SPSS v.11.5 paket bilgisayar istatistik programındaki Mann-Whitney U



Şekil 2. Skor 3 mukozal hasarın mikroskopik görüntüsü (x200, H&E)



**Şekil 3.** Skor 4 mukozal hasarın mikroskopik görüntüsü (x200, H&E)

ve Wilcoxon testleri kullanıldı. P değerinin 0.05'in altında olması anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

### Bulgular

**Makroskopik inceleme:** Postoperatif 1. ve 7. günde S, SE ve KGE gruplarında batın içi sıvısı berraktı ve greft canlı görünümdeydi (Şekil 4). KG grupunda ise batın içi sıvısı daha pürülandı ve kolon greftinin dolaşımı diğer gruplara göre daha kötü görünümdeydi.

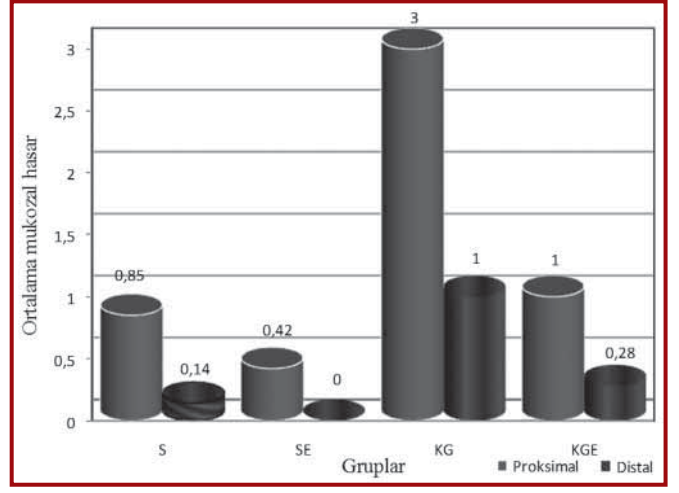
**Mikroskopik inceleme:** Postoperatif 1. ve 7. günlerde S ve SE grupları karşılaştırıldığında, hem proksimal hem de distal uçlarda mukozal hasar bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 5,6).

KG grubunun postoperatif 1. ve 7. gün greft proksimal uç mukozal hasarının KGE grubundan anlamlı olarak daha fazla olduğu izlendi ( $p=0.006$  ve  $p=0.004$ ) (Şekil 5,6).

Sham gruplarının proksimal uçlarının, postoperatif 1. ve 7. gün KG grubu ile karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık saptanırken, KGE grubu ile olan karşılaştırılmasında farklılık saptanmadı (Şekil 5,6).



**Şekil 4.** Postoperatif 7. günde kolon grefti+eritropoetin grubunda kolonun genel görünümü



**Şekil 5.** Postoperatif 1. günde ortalama mukoza hasar dereceleri

Distal uçların incelenmesinde, postoperatif 1. ve 7. gün KG ve KGE grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ) (Şekil 5,6).

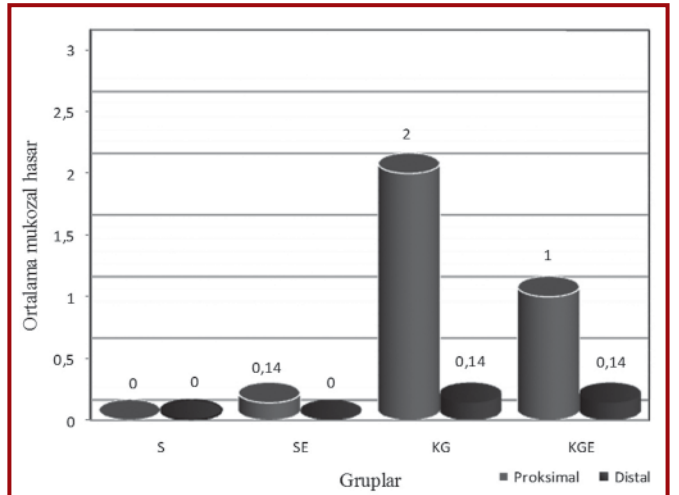
KG ve KGE gruplarının kendi grupları içerisinde, proksimal ve distal uçlarının postoperatif 1. ve 7. gün karşılaştırmalarında anlamlı bir farklılık saptanmamış olmasına rağmen, 1. gün hasarlanmasının daha belirgin olduğu gözlenmiştir (Şekil 5,6).

Tüm denek gruplarında iskemik değişiklikler mukozaya ile sınırlı olup, gerek submukozal, gerekse miyenterik sinir pleksusları ve gangliyon hücreleri olağan sayı ve histolojide izlendi.

### Tartışma

Bu çalışma intraoperatif EPO uygulamasının, iskemiye bağlı olan mukozal hasarın önlenmesinde erken dönemde faydalı olduğunu göstermektedir.

Ösefagusun geriye dönüşümsüz bir şekilde hasar görerek kullanılmaz hale geldiği durumlarda ösefagus replasmanı çoğu kez tek seçenektir. Bu amaçla en sık sol kolon, transvers kolon, sağ kolon ve ileo-



**Şekil 6.** Postoperatif 7. günde ortalama mukoza hasar dereceleri



kolik segmentler kullanılır. Transvers kolon veya sol kolonun replasman amacıyla kullanılması, terminal ileum, çekum veya sağ kolonun kullanılmasından daha avantajlıdır (1,2). Bu nedenle çalışmamızda sol kolon kullanılmıştır.

Greftin yeterli düzeyde canlı kalmasında, iskeminin süresi, arteriyel dolaşımın yeterliliği ve venöz konjesyon oldukça önemlidir. İnterpoze kolon segmenti tek bir vasküler pediküle bağlı olduğu için, herhangi bir nedenle arteriyel kan akımının bozulması postoperatif komplikasyon oranlarını belirgin olarak artırmaktadır (5,12).

Tüm kolon interpozisyon tekniklerinde, greft kullanılacak bölgeye taşınırken vasküler pedikül üzerinde az ya da çok gerilim meydana gelmektedir. Gerçekte pedikül geriliminin ve torsiyonunun neden olduğu hipoksi ve sonrasında kanlanmanın tekrar sağlanması ile oluşan lokal ya da genel reperfüzyon hasarı ile venöz obstrüksiyon tüm bu yöntemlerin başarısızlığa uğramasının en yaygın nedenidir.

Murthy ve ark.nın SMA'yi oklüze ederek yaptıkları bir çalışmada, kolonun bilinen antioksidanlar ile önceden yapılan tedavisinin, vasküler ve mukozal işlevsel değişikliklere ve hasar verici biyokimyasal olayların zayıflayan etkinliğine karşı anlamlı bir koruma sağladığı belirtilmiştir (13).

Juul ve ark. 14-16 haftalık insan fetüslerinde EPO'nin intestinal reseptörlerini ortaya koymuşlar ve EPO'nin enterosit migrasyonunu, mukozal hücre sağlamlılığını ve proliferasyonu artırdığını kanıtlamışlardır. Hipoksiye yanıt olarak ortaya çıkan bir hormon olan EPO'nin intestinal hasarlanmayı önleyebileceği düşüncesinin temelini bu çalışmalar oluşturmaktadır (9,14,15). Kanımızca, EPO verilen grupta mukozal hasarın daha az olmasının nedeni, EPO'nin trofik ve lokal iskemi reperfüzyon hasarını önleyip intestinal proliferasyonu artırmasına bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Histopatolojik değerlendirme ile saptadığımız geç dönem mukozal hasarlanmanın hem KG hem de KGE grubunda daha düşük derecelerde olması adaptasyon yanıtı ve doku iyileşmesinin ölçütü olarak değerlendirilmiştir. Bu durum geç dönemde iskemik değişikliklere bağlı mukozal hasarlanmanın zamanla da düzelebileceğini göstermektedir. Verilerimiz iskemi reperfüzyon hasarına bağlı akut kolon hasarının 6. günden sonra iyileşme dönemine girdiğini desteklemektedir (16).

Hazırlanan kolon greftlerinde, pediküle uzak olan uç kısımda iskemik hasarlanmanın daha belirgin olduğu gözlenmiştir. İskemik ön hazırlık yapılmadan yapılacak bir anastomoz kaçak insidansını artırabilecektir.

Şu ana kadar yapılan deneysel çalışmalarda, iskemi reperfüzyon hasarlanması; mezenter arter kökü ligasyonu ve rezeksiyon-anastomoz gerçekleştirilen intestinal anlarda incelenmiştir. Bu modeller özellikle ösefagus replasmanı sonrası oluşan iskemi reperfüzyon hasarı ve tedavisi için kullanılan ajanları test etmekte yetersiz kalmaktadır. Bu çalışmada uyguladığımız cerrahi model ise ösefagus replasmanı operasyonuna çok benzemekte olup, çalışmanın ve sonuçların daha gerçekçi olmasında etkili olmuştur (17).

Sonuç olarak bu çalışma, preoperatif intraperitoneal EPO uygulamasının, kolon grefti hazırlanmış ratlarda mukozal hasarlanmayı belirgin olarak azalttığını göstermektedir. Gelecekte EPO'in gerek iskemi reperfüzyon hasarında, gerekse lokal intestinal hasarlanmadaki koruyucu rolü immünohistokimyasal çalışmalar, doku kültürü çalışmaları ve klinik çalışmalar ile daha geniş olarak değerlendirilmelidir.

### Kaynaklar

1. Ngan SY, Wong J. Lengths of different routes for esophageal replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986; 91: 790-792.
2. Tannuri U, Maksoud Filho JG, Maksoud JG. Esophagoplasty in children: surgical technique with emphasis on the double blood supply to the interposed colon, and results. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 1434-1438.
3. Jeffrey HP, Jeffrey WK, Michael K. Arterial anatomic considerations in colon interposition for esophageal replacement. *Arch Surg* 1995; 130: 858-862.
4. Bassiouny IE, Al-Ramadan SA, Al-Nady A. Long-term functional results of transhiatal oesophagectomy and colonic interposition for caustic oesophageal stricture. *Eur J Pediatr Surg* 2002; 12: 243-247.
5. Tsao CK, Chen HC, Chuang CC, et al. Adequate venous drainage: the most critical factor for a successful free jejunal transfer. *Ann Plast Surg* 2004; 53: 229-234.
6. Henrich DE, Lewis RS, Logan TC, Shockley WW. The influence of arterial insufficiency and venous congestion on composite graft survival. *Laryngoscope* 1995; 105: 565-569.
7. Krantz SB. Erythropoietin. *Blood* 1991; 77: 419-434.
8. Cerami A. Beyond erythropoiesis: novel applications for recombinant human erythropoietin. *Semin Hematol* 2001; 38: 33-39.
9. Ledbetter DJ, Juul SE. Erythropoietin and the incidence of necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 178-182.
10. Juul SE, Joyce AE, Zhao Y, et al. Why is erythropoietin present in human milk? Studies of erythropoietin receptors on enterocytes of human and rat neonates. *Pediatr Res* 1999; 46: 263-268.
11. Felix WL, Kenny CS, Jose MP. Superior mesenteric artery is more important than inferior mesenteric artery in maintaining colonic mucosal perfusion and integrity in rats. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1329-1335.
12. Peter J, Ido S, Jehuda I, Lael-Anson B. Delivery following colon interposition. *Chest* 2003; 124: 2027-2028.

13. Murthy S, Hui-Qi Q, Sakai T. Ischemia/reperfusion injury in the rat colon. *Inflammation* 1997; 21: 173-190.
14. Juul SE, Ledbetter DJ, Joyce AE. Erythropoietin acts as a trophic factor in neonatal rat intestine. *Gut* 2001; 49: 182-189.
15. Fatouros MS, Vekinis G, Bourantas KL. Influence of growth factors, erythropoietin and granulocyte macrophage colony stimulating factor on mechanical strength and healing of colonic anastomoses in rats. *Eur J Surg* 1999; 165: 986-992.
16. Felix WL, Kenny CS, Yoshikazu Y. Regional differences in mucosal hemodynamics in experimental colonic injury in rats. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 1220-1223.
17. Zimmerman JB, Grisham MB, Granger N. Role of oxidants in ischemia/reperfusion-induced granulocyte infiltration. *Am J Physiol* 1990; 21: 185-190.