

Dr. Mehmet Refik MAS
Dr. Ümit ATEŐKAN
Dr. Ahmet İRFAN
Dr. Selim NALBANT
Dr. Hüseyin DORUK
Dr. Hakan ERDEM
Dr. M. Tahir ÜNAL
Dr. Fikri KOCABALKAN

YAŞLI GUİNEA PİG'LERDE KOLESİSTOKİNİN VE ERİTROMİSİNİN, SAFRA KİMYASI VE SAFRA TAŞI OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŐILAŐTIRILMASI

COMPARISON OF EFFECTS OF CHOLECYSTOKININ AND ERYTHROMYCIN ON BILE CHEMISTRY AND GALLSTONE FORMATION IN THE AGED GUINEA PIGS

ÖZET

Safra taşı oluşumunun altında yatan patojenik mekanizmaları incelemeye yönelik giderek artan sayıda çalışma vardır. Özellikle safra kesesi motilitesi ve motiliteyi etkileyen faktörler, son yıllarda çok fazla ilgi görmektedir. Biz de çalışmamızda, yaşlı guinea pig'lerde, safra taşı oluşumu ve safra kimyası üzerine kolesistokinin (CCK) ve eritromisin etkilerini karşılaştırmayı amaçladık. Çalışma, GATA Araştırma Laboratuvarlarında yapıldı. 40 adet bir aylık ve 40 adet üç yaşında olmak üzere, iki guinea pig grubu ile çalışıldı. Her bir grup kendi içinde 10'arlık olmak üzere dört alt gruba ayrıldı. Dört hafta süre ile her yaş grubundan birer alt grup sadece litojenik diyetle beslenirken, birer alt gruba, litojenik diyetle beraber CCK, diğer bir alt gruba ise diyetle beraber eritromisin tedavisi uygulandı. Her iki gruptan 10'ar guinea pig, kontrol grubu olarak normal diyetle beslendi. Dört hafta sonra, safra taşının varlığı ve safra asidi, kolesterol, lesitin ve protein konsantrasyonlarını içeren safra kimyaları değerlendirildi. Çalışma sonunda bir aylık grupta biç safra taşı gözlenmezken, üç yaş grubunda sadece litojenik diyetle beslenen 10 guinea pig'in 9'unda ve her bir tedavi grubunun ve kontrollerin 4'er tanesinde safra taşı geliőtı. CCK ve eritromisin tedavileri safra kimyası ve taş oluşumu üzerine benzer etki gösterdiler. Sonuç olarak, yaşla beraber, guinea pig'lerde safra taşı oluşum insidansı artmaktadır. Eritromisin tedavisi, yaşlı guinea pig'lerde, kese motilitesini düzelterek safra taşı insidansını, CCK tedavisi kadar azaltmıştır. Bu sonuçlar özellikle safra çamuru tespit edilen yaşlı hastaların uzun vadeli tedavilerinde, eritromisin kullanımının da bir alternatif olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Safra taşı, Kolesistokinin, Eritromisin, Motilite, Litojenik diyet

ABSTRACT

There are growing numbers of studies evaluating the pathogenic mechanisms which underlie in gallstone formation. Gallbladder motility and factors that influence gallbladder motility are particularly gaining much interest in recent years. Our objective for this study was to compare the effects of cholecystokinin (CCK) and erythromycin treatments on bile chemistry and gallstone formation in the aged guinea pigs. Study was held in Gulhane Research Laboratories. Two guinea pig groups (40, 1-mo old and 40, 3-yr old) were studied. Each group was subdivided into four subgroups of each including 10 animals. While one subgroup of each age group was placed on lithogenic diet only, one subgroup was treated with CCK, the other with erythromycin in addition to lithogenic diet for 4 weeks. 10 guinea pigs from each group remained on normal diet as control group. After 4 weeks, the presence of gallstone and bile chemistry including bile acid, cholesterol, lecithin and protein concentrations were evaluated. We observed no gallstones in 1-mo old group. while in 3-yr old group, 9 of 10 guinea pigs on lithogenic diet and 4 of 10 guinea pigs of each treatment subgroups and control group developed gallstones. Treatments with CCK and erythromycin showed similar effects on bile chemistry and stone formation. In conclusion, aging increases the formation of gallstones in the guinea pigs. Erythromycin seems as effective as CCK in reducing the gallstone formation by improving gallbladder motility. These results suggest that the use of erythromycin could be an alternative in prevention of gallstones for long-term treatment of patients with biliary sludge.

Key Words: Gallstone, Cholecystokinin, Erythromycin, Motility, Lithogenic diet.

Geliő: 15.12.1999

Kabul: 01.02.2000

Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Geriatri Bilim Dalı-ANKARA

İletişim: Dr. M. Refik MAS: Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Geriatri Bilim Dalı-06018-Etilik/ANKARA

Tel: (0312)30440 16

Fax: (0312) 3234923

e-mail: mmmas@gata.edu.tr

GİRİŞ

Safra taşı hastalığı, Batı toplumlarında sık karşılaşılan bir problemdir ve görülme sıklığı %10-15 civarlarında olup, yağla birlikte prevalansı da artış gösterir.

Tüm safra taşlarının %75'ini kolesterol taşları oluşturur. Kolesterol safra taşlarının patogeneğinde fiziksel ve kimyasal olaylar rol oynamakta olup, primer neden, safranin lipid ve lipoprotein konsantrasyonundaki değişikliklerdir (2). Kolesterol taşının majör komponenti, kolesterol monohidrat kristalleridir. Bu kristallerin çekirdeklenmesi ve kristalizasyonu için, en az üç patolojinin, beraber bulunması gerekir. Bunlar, kolesterolün fizyolojik olmayan süper-satürasyonu, hızlanmış çekirdeklenme ve safra kesesi motilitesinin azalmasıdır. Safra kesesi ve ince barsağın motor fonksiyonlarının, safra tuzu salınımı ve havuz büyüklüğü ve biliyer lipid kompozisyonu üzerine önemli etkileri vardır. Safra kesesi ve intestinal kontraktilitede bozulma, safra tuzlarının enterohepatik siklusunu bozabilir ve safra tuzlarının azalmış hepatik salınımına neden olarak, artmış kolesterol satürasyonlu safra oluşumuna, sonucunda da taş oluşumuna yol açabilir. Kese kontraksiyonu ve boşalma, bir çok uyarıcı ve inhibe edici faktörlerin etkisinin net sonucudur. Vagal kofinerjik uyarı ve kolesistokininin (CCK) mediatör olduğu hormonal mekanizmalar, fizyolojik şartlarda kese boşalmasının en önemli kontrol mekanizmalarıdır (10). Boşalmanın hızı ve miktarını belirleyen majör faktör, CCK'dır (14). Yaşla beraber CCK reseptörlerindeki azalmaya bağlı, kesenin CCK'ya duyarlılığının azaldığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bir makrolid antibiyotik olan eritromisin, düşük, antimikrobiyal ajan olarak etkisiz dozlarda verildiğinde, insanlarda ve hayvan modellerinde, prematüre gezici motor kompleksleri (GMK) uyardığı gösterilmiştir (5,11,15). Etkisi, insanlarda ve köpeklerde periyodik GMK'lerin oluşumundan sorumlu olduğu düşünülen motilinin etkisine benzer (6,17). Son zamanlarda, eritromisinin, membranlara motilinin bağlanmasını engellediği ve etkisini gastrointestinal motilin reseptörlerini aktive ederek gösterdiği tespit edilmiştir (8,12). Eritromisin, safra boşalmasını, kolinerjik ve serotonerjik yollarla uyarmaktadır. Bu çalışmada biz, 4 hafta süre ile kolelitogenik diyetle alınan guinea pig'lerde, safra kimyası, safra çamuru ve/veya taş oluşumu üzerine, CCK-8 ve eritromisinin etkilerini karşılaştırmayı amaçladık.

YÖNTEM ve GEREÇ

Çalışma, GATA Araştırma Laboratuvarlarında yapılmış olup, 40'ı bir aylık yeni doğan ve 40 adet üç yaşında olmak üzere iki farklı yaş grubunda erkek guinea pig'lerle çalışıldı. Üç yaş, erkek laboratuvar guinea pig'lerde, ortalama yaşam süresidir. Tüm hayvanlar, ısı ayarlı, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusları olan bir ortamda tutuldu. Her gruptan 10 denek, yüksek kolesterollü (%7), düşük C-vitaminli (.100

mg/kg) kolelitogenik diyetle (TCN Biochemicals, Cleveland, Ohio) tabi tutuldu. 10'ar deneye kolelitogenik diyetle beraber, her gün intraperitoneal yolla %0.1'lik sıgır serum albumini içinde çözündürülmüş CCK-8 sülfat (Peninsula Laboratories, Cleveland, Ohio) uygulanırken, diğer bir 10 deneye ise diyetle beraber, nazogastrik besleme tüpü ile 2 mg/kg/gün eritromisin stearat verildi. Her gruptan kalan 10 denek ise, normal guinea pig yemi ile beslendi ve kontrol grubu oluşturuldu.

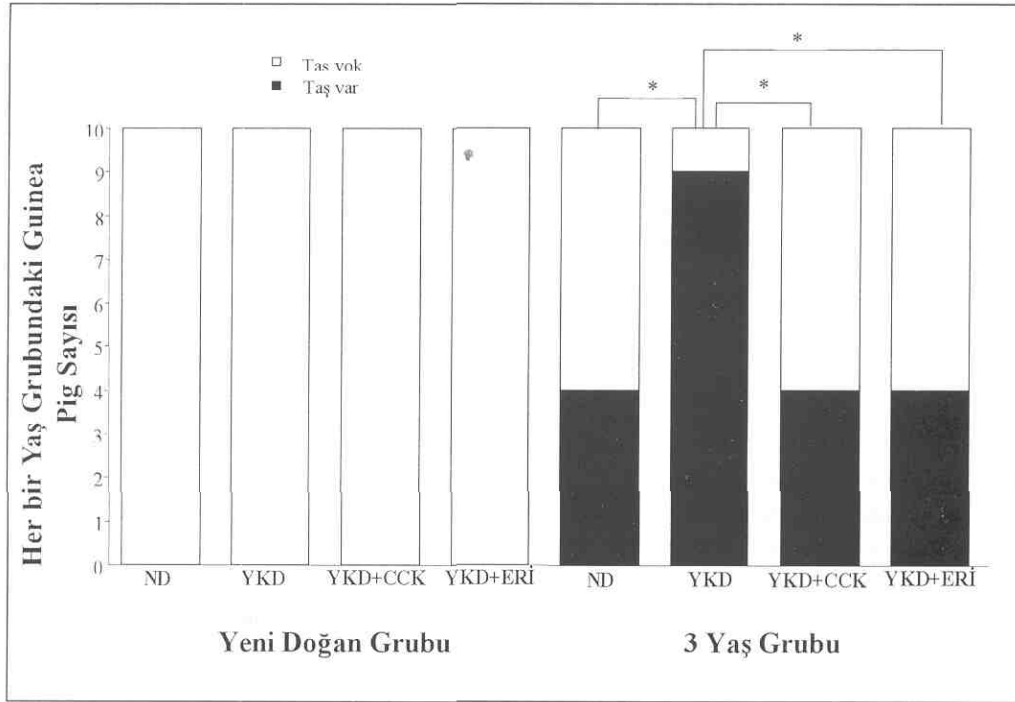
4 hafta sonra, guinea pig'ler sakrifiye edildi ve safra keseleri çıkartıldı. Safra toplanarak, safra taşı, safra çamuru ve kolesterol kristallerinin varlığı açısından, hem makroskopik, hem de mikroskopik olarak incelendi. Safra daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -40°C'de donduruldu.

Safra kolesterol konsantrasyonu, Alain ve arkadaşlarının kolesterol esteraz enzimatik sistemini kullandıkları metodla ölçüldü (1). Safra tuzu konsantrasyonu, Turley ve Ditschynin 3- α -hidroksi-steroid dehidrojenaz enzimatik sistemini kullanarak gerçekleştirdikleri metodla hesaplandı (16). Safra fosfolipid düzeyi Gomori metodu, safra protein konsantrasyonu ise Lowry metodu ile ölçüldü (4,9).

Safra taşı oluşan veya oluşmayan her bir yaş grubundaki denekler arası istatistikî karşılaştırma, ki-kare testi ile yapıldı ve P değerinin 0.05'ten küçük olarak hesaplandığı değerler anlamlı olarak kabul edildi. Safra kimyası ve safra taşı/safra kolesterolü oranlarının istatistikî analizi ise, Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı ve istatistikî anlamlılık 0.005'in altı olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmanın sonucunda, yeni doğan guinea pig'lerin hiç birisinde safra taşı veya safra çamuru gözlenmedi. Üç yaş grubunda, litojenik diyetdeki 10 denekten 9'u, litojenik diyet ve CCK-8 uygulananların 4'ü ve litojenik diyet ile birlikte eritromisin stearat verilenlerin de 4'ünde safra taşı gelişimi tespit edildi (Şekil 1). Normal diyetle beslenen 10 kontrol deneginden 4'ünde de safra taşı gelişti. Yaşlı guinea pig'lerde, sadece litojenik diyetle beslenenlerle, diyetle ek olarak, CCK-8 veya eritromisin tedavisi alanlar arasında, safra taşı oluşum sıklığı açısından farklılık istatistikî olarak anlamlı idi ($p<0.05$). Ancak, CCK-8 ve eritromisin tedavisi alanlar arasında safra taşı oluşumu açısından farklılık tespit edilmedi. Litojenik diyetin, hem yeni doğan hem de üç yaş denek gruplarında, normal diyetle beslenen kontrol grubu ile kıyaslandığında, safra kolesterol konsantrasyonlarını belirgin düzeyde arttırdığı tespit edildi (yeni doğan grubu $p<0.002$, $z=-3.785$; üç yaş grubu $p<0.002$, $z=-3.594$). CCK ve eritromisin tedavisi, yaşlı grupta kolesterol konsantrasyonlarını etkilemezken, yeni doğan grubunda, belirgin şekilde düşürmüştür (CCK $p<0.002$, $z=-3.789$; eritromisin $p<0.002$, $z=-3.786$). Her iki yaş grubunda, CCK ve



* Gruplar arası safra taşı prevalans farklılıkları ($p < 0.05$), ND: Normal Diyet, YKD: Yüksek Kolesterolü Diyet, CCK: Kolesistokin, ERİ: Eritromisin

Şekil-1: Guinea pig'lerde diyet, yaş, kolesistokin ve eritromisin, safra taşı oluşumu üzerine etkileri

eritromisin tedavileri arasında bir farklılık tespit edilmemiştir (Tablo 1).

Safra lesitin konsantrasyonları, yeni doğan grubunda litojenik diyetle belirgin düşüş göstermiş olup ($p < 0.002$, $z = 3.788$), CCK ve eritromisin tedavileri,

lesitin konsantrasyonlarında anlamlı yüksekliklere yol açmıştır (CCK $p < 0.002$, $z = -3.792$). CCK ve eritromisin tedavileri, üç yaş grubunda da lesitin düzeylerini yükseltmede etkili idi (CCK $p < 0.005$, $z = -2.708$; eritromisin $p < 0.003$, $z = -2.962$). Her iki grupta da,

Tablo-1: Guinea pig'lerde, diyet, kolesistokin ve eritromisin, safra kimyası üzerine etkileri. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir.

	Yeni Doğan Grubu				
	Safra Asidi mikromol/ml	Kolesterol mikromol/ml	Lesitin mikromol/ml	Protein mg/dl	Safra asidi/Kolesterol Oranı
Normal Diyet	45.88±4.50	0.186±0.007	2.43±0.36	2.16±0.20	56.42±5.9
YKD	20.84±1.86 ^a	1.231±0.04 ^a	0.62±0.31 ^a	2.28±0.12	16.83±1.5 ^a
YKD+CCK-8	20.86±1.89	0.676±0.07 ^b	1.43±0.15 ^b	2.35±0.15	31.03±3.4 ^b
YKD+ERİ	20.21±1.33	0.682±0.05 ^b	1.47±0.21 ^b	2.19±0.23	29.64±0.85 ^b
	Üç Yaş Grubu				
	Safra Asidi mikromol/ml	Kolesterol mikromol/ml	Lesitin mikromol/ml	Protein mg/dl	Safra asidi/Kolesterol Oranı
Normal Diyet	34.95±3.02	0.731±0.05	1.84±0.20	1.57±0.42	48.03±5.37
YKD	23.10±2.05 ^a	0.909±0.07 ^a	2.00±0.18	3.22±0.32 ^a	25.64±4.04 ^a
YKD+CCK-8	22.91±2.09	0.900±0.05	2.26±0.17 ^b	2.55±0.47 ^b	25.53±3.40
YKD+ERİ	23.07±2.09	0.876±0.05	2.36±0.25 ^b	2.54±0.45 ^b	25.45±3.32

a: aynı yaş grubundaki normal diyetle beslenen guinea pig'lere göre belirgin farklılık ($p < 0.005$), b: aynı yaş grubundaki yüksek kolesterolle beslenen guinea pig'lere göre belirgin farklılık ($p < 0.005$), YKD: Yüksek Kolesterolü Diyet, CCK-8: Kolesistokin, ERİ: Eritromisin

CCK ile eritromisin'in etkileri açısından bir farklılık tespit edilmedi.

Safra protein konsantrasyonları, yeni doğan grubunda litojenik diyet, CCK ve eritromisin tedavileri ile belirgin değişiklik göstermezken, üç yaş grubunda, litojenik diyetle anlamlı artış gösterip ($p<0.002$, $z=-3.786$), CCK ve eritromisin tedavileri ile belirgin olarak düşmüştür. (CCK $p<0.002$, $z=-3.801$; eritromisin $p<0.003$, $z=-2.923$) Her iki tedavinin etkinliği açısından herhangi bir fark tespit edilmemiştir (Tablo 1).

Safra tuzu konsantrasyonları, her iki yaş grubunda, litojenik diyetle belirgin olarak azalma gösterirken (yeni doğan grubu $p<0.001$, $z=-3.781$; üç yaş grubu $p<0.002$, $z=-3.782$), CCK ve eritromisin tedavilerinin, safra tuzu düzeyleri üzerine anlamlı bir etkisi olmamıştır (Tablo 1).

Safra tuzu/kolesterol konsantrasyon oranlarına baktığımızda, normal diyetle beslenen kontrol grubu ile kıyaslandığında, litojenik diyetle yeni doğan grubunda %70 ve yaşlı grupta %47 oranında azalma tespit edilmiştir. CCK ve eritromisin tedavileri, yeni doğan grubunda oranları sırası ile %80 ve %75 artırırken, üç yaş grubunda, oran üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda, yüksek kolesterol diyeti ile beslenen guinea pigler'de safra taşı oluşumunun yaşla birlikte artış gösterdiği tespit edilmiştir. Günde tek doz CCK-8 uygulaması, üç yaş denek grubunda, safra taşı insidansının azalmasına yol açmıştır. Diğer taraftan, bu yaş grubunda günde tek doz eritromisin uygulaması da, safra taşı oluşum insidansını azaltmakta, CCK-8 kadar etkili olmuştur.

Her ne kadar litojenik diyet bir aylık deneklerde, safra tuzu, lesitin, safra tuzu/safra kolesterol oranlarında (%70 azalma) belirgin bir azalmaya neden olmuş olsa da, bu grupta çalışma sonunda taş oluşumu gözlenmemiştir. Bu bulgu, kese motilitesinin genç deneklerde normal olması ile açıklanabilir. CCK-8 ve eritromisin tedavileri sonucu safra kimyasında oluşan değişikliklerde gözlenen düzelmeler, süpersatüre ve mikrokristalize olan kolesterol monohidrat partiküllerinin erken dönemde ortamdan uzaklaştırılmasına bağlı olabilir. Safra tuzu konsantrasyonundaki azalma, yüksek kolesterol içeren diyetle beslenmenin bir sonucu olup, nedeni kolesterolden safra asiti sentezinde hız sınırlayıcı enzim olan hepatik kolesterol 7-hidroksilaz enzim aktivitesinde azalmadır (18).

Üç yaş denek grubunda, litojenik diyet, safra kolesterol, protein konsantrasyonlarını arttırırken, safra tuzu ve safra tuzu/ kolesterol oranında da azalmaya neden olmuştur. Yaşlı grupta gözlenen safra taşı insidansındaki yükseklik, bu değişikliklere bağlı olabilir. CCK-8 ve eritromisin tedavi-

leri, bu grupta safra taşı görülme sıklığını azaltmıştır. Tedavi gruplarında, safra kolesterolü, safra tuzu ve safra tuzu/kolesterol oranında hiçbir değişiklik olmazken, safra lesitin düzeylerinde belirgin bir yükseklik, protein konsantrasyonlarında ise anlamlı bir düşüklük tespit edilmiştir. Üç yaş grubu deneklerde, CCK tedavisinin safra protein ve lesitin konsantrasyonları üzerine etkisi ile ilgili sonuçlarımız, CCK tedavisi ile hiç bir değişiklik gözlemeyen Poston ve arkadaşlarının bulguları ile bağdaşmamaktadır (13). Hem yaşa bağlı safra kesesi motilite bozuklukları, hem de yüksek kolesterolü diyet, safranın süpersatürasyonuna yol açabilir. Artmış lesitin konsantrasyonları, safradaki aşırı kolesterolün çözünürlüğünü arttırarak, taş oluşumunu engelleyici rol oynayabilir (3). Yüksek biliyer protein konsantrasyonları, kolesterol kristalleri ile ilişkili olabilir ve bu nedenle kese taşı patogeneğinde muhtemel bir risk faktörü teşkil edebilir (7).

Çalışmamızda, litojenik diyet, safra protein konsantrasyonlarını belirgin şekilde yükseltmiş olup, CCK ve eritromisin tedavilerinin, konsantrasyonları düşürdüğü gösterilmiştir. Safra protein düzeylerindeki bu düşüş, muhtemelen tedavi gruplarındaki düşük safra taşı insidansını açıklamaktadır.

Sonuç olarak, safra kesesi motilitesi arttırılarak, litojenik safranin fizikokimyasal özelliklerinin belli ölçüde düzeltilmesinin, kese taşı oluşumunu engellemeye yardımcı olabileceği düşüncesindeyiz. Çalışmamızda, eritromisin'in safra kimyasını düzeltme ve taş oluşum riskini azaltmada, kese motilitesinin ana hormonal modülatörü olan CCK kadar etkili olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, yüksek riskli hastaların uzun vadeli tedavilerinde, kese taşı oluşumunu engellemede, eritromisin kullanımının mümkün olabileceğini göstermektedir. Bu denli düşük ve mikrobiyolojik olarak etkisiz dozlarda eritromisin'in uzun süreli kullanımı güvenli gibi görülse de, etkinliğini ve muhtemel yan etkilerini daha iyi değerlendirebilmek için insanlarda yapılmış uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Allain CC, Poon LS, Chan CSG: Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem 1974; 20: 470-475.
2. Carey MC: Pathogenesis of gallstones. Am J Surg 1993; 165:410-419.
3. Carey MC, LaMont JT: Cholesterol gallstone formation. I.Physical-chemistry of bile and biliary lipid secretion. Prog Liver Dis 1992; 10:139-63.
4. Gomori G: A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. J Lab Clin Med 1942;27:955-960.
5. Itoh Z, Nakaya M, Suzuki T: Erythromycin mimics exogenous motilin in gastrointestinal contractile activity in the dog. Am J Physiol 1984; 247:688-694

6. Itoh Z, Takeuchi S, Aizawa I: Changes in plasma motilin concentration and gastrointestinal contractile activity in conscious dog. *Am J Dig Dis* 1978; 23:929-935.
7. Jungst D, Lang T, Von Ritter C: Role of high total protein in gallbladder bile in the formation of cholesterol gallstones. *Gastroenterology* 1991; 100:1724-1729.
8. Kondo Y, Torii K, Orama S: Erythromycin and its derivatives with motilin-like biological activities inhibits the specific binding of ¹²⁵I-motilin to duodenal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 150:877-882.
9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
10. O'Donnell LD, Fairclough PD: Gallstones and gallbladder motility. *Gut* 1993; 34:440-443.
11. Otterson MF, Sarna SK: Gastrointestinal motor effects of erythromycin. *Am J Physiol* 1990; 259:355-363.
12. Peeters TL, Matthijs G, Depoortere I: Erythromycin is a motilin receptor agonist. *Am J Physiol* 1989; 257:470-474.
13. Poston GJ, Draviam EJ, Yao CZ: Effect of age and sensitivity to cholecystokinin on gallstone formation in the guinea pig. *Gastroenterology* 1990; 98: 993-999.
14. Shiratori K, Watanabe S, Chey WY: Endogenous cholecystokinin drives gallbladder emptying in dogs. *Am J Physiol* 1986; 251: 552-558.
15. Tomomasa T, Kuroumi T, Arai H: Erythromycin induces migrating motor complex in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 1986; 31:157-161.
16. Turley SD, Dietschy JM: Re-evaluation of the 3 α -hydroxy-steroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. *J Lipid Res* 1978; 19:924-931.
17. Vantrappen G, Janssens J, Peters TL: Motilin and the interdigestive migrating motor complex in humans. *Dig Dis Sci* 1979; 24:497-500.
18. Vlahcevic ZR, Heuman DM, Hylemon PB: Regulation of bile acid synthesis. *Hepatology* 1991; 13:590-600.