



T.C.

MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA LİPOPOLİSAKKARİT (LPS) İLE  
OLUŞTURULAN SEPSİS MODELİNDE  $\beta$ -HİDROKSİ  $\beta$ -  
METİL BUTİRAT'IN (HMB) BOZULMUŞ KOLON  
ANASTOMOZUNDA İYİLEŞME ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. ALİ GÖRKEM YILDIRIM  
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. AHMET KORAY ÖCAL

MERSİN – 2013



T.C.

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA LİPOPOLİSAKKARİT (LPS) İLE  
OLUŞTURULAN SEPSİS MODELİNDE  $\beta$ -HİDROKSİ  $\beta$ -  
METİL BUTİRAT'IN (HMB) BOZULMUŞ KOLON  
ANASTOMOZUNDA İYİLEŞME ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. ALİ GÖRKEM YILDIRIM  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. AHMET KORAY ÖCAL**

**Bu tez, BAP-TF CTB (GY) 2012-3 TU kodlu proje olarak Mersin  
Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
desteklenmiştir.**

**MERSİN – 2013**

## TEŞEKKÜR

Cerrahi eğitimim sürecinde bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Süha AYDIN, Prof. Dr. Musa DİRLİK, Prof. Dr. Tahsin ÇOLAK, Prof. Dr. Koray ÖCAL, Prof. Dr. Tamer AKÇA, Doç. Dr. Hakan CANBAZ, Doç. Dr. Ahmet DAĞ, Yrd. Doç. Dr. Özgür TÜRKMENOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Aydemir ÖLMEZ ve Uzm. Dr. Bahattin ÖZLÜ' ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tezime katkılarından dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Koray ÖCAL başta olmak üzere Doç. Dr. Ahmet Dağ'a, Biyofizik Anabilim dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na, Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN'e, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Lülüfer Tamer GÜMÜŞ ve Arş. Gör. Dr. Ayşegül GÖRÜR'e, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ebru SERİNSÖZ ve Arş. Gör. Dr. Canan PORGALI' ya yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ali Görkem YILDIRIM

Mersin - 2013

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	10
Sepsis	10
Yara İyileşmesi	12
Lipopolisakkarit Antijeni (LPS)	24
$\beta$ -hidroksi $\beta$ -metilbutirat (HMB)	26
Malondialdehit (MDA)	30
Miyeloperoksidaz (MPO)	30
SüperoksitDismutaz(SOD)	30
NitritOksid(NO)	31
GEREÇ VE YÖNTEMLER	32
BULGULAR	43
TARTIŞMA	62
SONUÇ VE ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR	71
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	88
ŞEKİLLER DİZİNİ	90
TABLolar DİZİNİ	91
RESİMLER DİZİNİ	92

## ÖZET

Sepsis kolon anastomozu sonrasında iyileşmeyi bozan en ciddi risk faktörüdür. Çalışmamızda  $\beta$ -hidroksi  $\beta$ -metilbutirat'ın (HMB) deneysel olarak LPS ile oluşturulmuş sepsis modelinde kolon anastomozu iyileşmesine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma dört gruptan (10'ar rat) oluştu. Gruplardan KA'da kolon anastomozu (KA), LPS+KA'da LPS ortamında KA, KA+HMB'de KA'da HMB tedavisi ve LPS+KA+HMB'de KA'da LPS ve HMB tedavisi uygulandı. Sepsis oluşturmak için LPS (2 mg/kg, i.p.) KA'dan 18 saat önce uygulandı. HMB (1x2 mg/kg/gün, gavaj ile) tedavisi KA'dan 12 saat sonra başlanıp 7 gün devam etti. KA'dan 7 gün sonra ratlar sakrifiye edildi. Gruplar fizyolojik, biyokimyasal ve histopatolojik parametrelerle değerlendirildi. Fizyolojik olarak ağırlık değişimi ve anastomoz patlama basıncı kullanıldı. Biyokimyasal olarak kanda lökosit, serumda tümör nekroz faktör- $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ], miyeloperoksidaz [MPO], nitritnitrat, süperoksit dismutaz [SOD], hidroksiprolin, malondialdehit [MDA] bakıldı. Anastomoz dokusunda MPO, MDA, SOD, nitrit-nitrat, hidroksiprolin ve TNF- $\alpha$  incelendi. Histopatolojik olarak Hematoksilin-Eozin [H-E] ve immünohistokimyasal indüklenebilir nitrik oksit sentaz [iNOS]) ile değerlendirildi.

HMB'nin kullanıldığı gruplarda istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da anastomoz patlama basıncında artış olduğu, serum MDA düzeylerinde ise KA+LPS+HMB grubunda yükseklik olduğu görüldü. Serum ve doku SOD seviyelerinde HMB istatistiksel olarak anlamlı artışa neden oldu, doku Nitrit-nitrat düzeylerinde HMB istatistiksel olarak anlamlı düşüşe neden oldu. HMB serum hidroksiprolin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farka neden oldu. Histopatolojik incelemelerde; H-E ile fibrozisin ve inflamasyonun değerlendirildiği gruplar ve yine INOS'lu gruplarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Sonuç olarak LPS ile oluşturulan sepsiste HMB tedavisinin sepsis nedeniyle bozulmuş olan kolon anastomozunda anastomozun fiziksel gücüne katkıda bulunduğu ve inflamasyonu azaltarak yara iyileşmesini olumlu etkilediğini düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** Kolon Anastomozu, Beta-Hidroksi Beta-Metilbütirat, LPS, sepsis.

## ABSTRACT

### **The Effects of Beta-Hydroxy Beta-methylbutyrate on The Healing of Colonic Anastomosis in An Experimental Sepsis Model Induced by Lps in Rats**

Sepsis is the most serious factor in the recovery period after colon anastomosis. In our study, we aimed to investigate the effects of  $\beta$ -hydroxy  $\beta$ -methylbutyrate (HMB) on colon anastomosis healing in a sepsis model created experimentally by LPS.

The study consisted of 4 groups (10 rats in each). In group KA colonic anastomosis, in LPS+KA KA induced by LPS, in KA+HMB HMB treatment in KA, in LPS+KA+HMB HMB treatment and LPS in KA was performed. In order to create sepsis LPS was applied 18 hours before colon anastomosis. HMB treatment started 12 hours after colon anastomosis and continued for 7 days. Then the rats were sacrificed. The physiological, biochemical, and histopathological parameters of groups were evaluated. Weight changes and burst pressure of the anastomosis were evaluated for physiological parameters. Leukocytes in blood and tumor necrosis factor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), myeloperoxidase (MPO), nitrite-nitrate, superoxide dismutase (SOD), hydroxyproline, and malondialdehyde (MDA) evaluated in serum, MPO, MDA, SOD, nitrite-nitrate, hydroxyproline, and TNF- $\alpha$  were evaluated in the anastomosed tissue for biochemical parameters. Hematoxylin-Eosin (H&E) and immunohistochemical inducible nitric oxide synthase (iNOS) were evaluated for histopathological parameters.

Although there was no significant difference in HMB groups, the burst pressure of the anastomosis increased and serum MDA levels were increased in the KA+LPS+HMB group. HMB caused increased SOD levels significantly in both serum and tissue, and decreased nitrite-nitrate levels in tissue. HMB caused significant difference in serum hydroxyproline levels. In the histopathological analyses, statistically no significance was found in groups where H&E, fibrosis, and inflammation were assessed. Also, there was no significant difference in groups with iNOS. As a result, we thought that HMB treatment contributes physical strength by reducing inflammation and affecting positively on wound healing in sepsis caused by LPS in impaired colon anastomosis.

**Key words:** colonic anastomosis,  $\beta$ -Hydroxy  $\beta$ -methylbutyrate, LPS, sepsis.

## GİRİŞ VE AMAÇ

Yapılmış olan klinik çalışmalarda distal kolon anastomozlarında kaçak oranı %1.8-17 arasında görülmektedir ve anastomoz kaçaklarının mortalitesi %6-50 arasında değişmektedir<sup>1-4</sup>. Divertikülit, tümör perforasyonu ve benzeri intraabdominal septik durumlar kolon anastomoz kaçağı için risk oluşturmaktadır<sup>5</sup>. İntraabdominal enfeksiyon varlığında (divertikülit, tümör perforasyonu, jeneralize peritonit) altta yatan kolon hastalığının tedavisinde izlenecek yol halen tartışmalıdır<sup>6,7</sup>. Hastalıklı kolon segmentinin rezeksiyonu ve primer anastomoz, rezeksiyon ve Hartman prosedürü veya rezeksiyon + primer anastomoz + proksimal stoma uygulanabilecek tedavi seçenekleridir<sup>8</sup>. Hartman prosedürü divertikülit, tümör perforasyonu ve intraabdominal enfeksiyon gibi yüksek riskli durumların halen en çok tercih edilen tedavi seçeneğidir<sup>9</sup>. Ancak bu vakalarda Hartman prosedürü ve benzeri prosedürlerin uygulanmasından sonra stomaların %20-50'si kapatılmamaktadır ve bu işlemin postoperatif komplikasyon oranı primer anastomozdan daha fazladır<sup>8</sup>.

Aşağı yerleşimli rektum anastomozlarında koruyucu stoma yapılması mortalitede değişikliğe neden olmazken anastomoz kaçak riskini azaltmaktadır. Bu da anastomoz kaçaklarının neden olduğu artmış reoperasyon ihtiyacını dolaylı olarak azaltmaktadır<sup>10</sup>. Bir diğer yandan koruyucu amaçlı stomaların kapatılması da bazı sorunları ortaya çıkarmaktadır; bu işlemin %0.4 mortalitesi ve %17 morbiditesi bulunmaktadır<sup>11</sup>. Mevcut problemler değerlendirildiğinde, kolon rezeksiyonu gereken sepsisli hastalarda ilave cerrahi girişim gerektirmeyecek primer anastomozu düşük anastomoz kaçağı riski ile başarabilmek amaçlanmaktadır.

Son zamanlarda, eldeki bilgiler göz önünde bulundurulduğunda anastomoz yönünden çok yüksek risk oluşturmayan uygun hastalarda tedavi tercihinin rezeksiyon ve primer anastomoz yapılması yönünde olduğu görülmektedir. Ancak yüksek riskli hastalarda bu yöntemin güvenilirliği halen tartışmalıdır<sup>11</sup>. Anastomoz iyileşmesini olumlu etkileyecek yeni ilaçların tanımlanması ve kullanılması önemli klinik katkılar sağlayacaktır. Özellikle yüksek riskli hastalarda koloanal anastomoz,

ileal poş veya Hartman prosedürlerindeki geleneksel saptırıcı stomalardan kaçınmak ve primer anastomoz yapmak mümkün olacaktır.

Hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalarda sepsis ve intraabdominal enfeksiyon varlığında kolon anastomozlarının iyileşmesinin olumsuz etkilendiği gösterilmiştir<sup>12-14</sup>. Endotoksinlerin neden olduğu inflamatuvar ortamda anastomozlarda kollajen sentezi ve dolayısıyla anastomozdaki mekanik gerilime dayanma gücü azalmaktadır; bunun sonucunda iyileşme kriterlerinden biri olan anastomoz patlama basıncında düşmeyle kendini göstermektedir<sup>12-14</sup>. Sepsis ortamında proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$ 'nın arttığı ayrıca anastomoz bölgesinde de iNOS'un arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte artmış olan TNF- $\alpha$ 'nın ve iNOS'un kolon anastomozlarında iyileşmeyi olumsuz etkilediği de gösterilmiştir. Lipopolisakkarit (LPS) de endotoksemiye indükleyerek TNF- $\alpha$ , iNOS ve kolon anastomoz iyileşmesi üzerinde aynı etkileri göstermektedir<sup>12,15,16</sup>.

HMB ( $\beta$  – hidroksi  $\beta$  – metilbutirat), doğal olarak insan kas hücrelerinde bulunan bir aminoasit metabolitidir. HMB aynı zamanda avokado, narenciye, karnıbahar, anten balığı ve yonca gibi bazı bitki ve hayvanlarda da bulunmaktadır. HMB'nin aynı zamanda ticari olarak üretilen ve kalsiyum HMB monohidrat (CaHMB) şeklinde besin desteği formu da mevcuttur<sup>18</sup>. İnsan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki HMB protein sentezini artırmakta, protein yıkımını ise azaltmaktadır<sup>19</sup>. Deneysel olarak HMB, atletler tarafından performans geliştirici ve kas kitlesini arttırıcı madde olarak da kullanılmaktadır<sup>19</sup>. Yakın zamanda yapılan araştırmaların çoğu, yağsız vücut kitlesi (YVK) kaybı olan insanlarda HMB'nin kullanımının hasar, sakatlık ya da mortalite üzerine olan etkileri konusunda yoğunlaşmıştır. Bu araştırmalara göre, YVK kaybı olan yaşlı ve AIDS/kanser gibi kronik hastalığı olan insanlarda, diğer aminoasidlere göre HMB desteğinin daha faydalı olduğu gösterilmiştir<sup>20,21, 22, 23</sup>. Literatürde sepsis ortamında yapılan kolon anastomozunda kullanılan farklı ilaçlarla oluşturulmuş çalışmalar bulunmaktadır<sup>12,13</sup>. Ancak HMB'nin kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut bilgiler ışığında LPS'nin TNF- $\alpha$  ve iNOS'u arttırarak kolon anastomoz iyileşmesini olumsuz etkilediği bilindiğinden sepsiste ekzojen HMB verilmesinin TNF- $\alpha$  ve iNOS'u azaltıp SOD ve hidroksprolin düzeylerini ise arttırarak antioksidan etki ile anastomoz iyileşmesini olumlu etkileyeceği hipotezini öne



sürdük. HMB'nin sıçanlarda deneysel olarak LPS ile oluşturulan sepsis modelinde kolon anastomozunun iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Deneyin sonucunda vücutta lösin metabolizmasının bir ara ürünü olarak sentezlenen HMB'nin, ekzojen verilmesi sonrasında sepsis ortamında yapılan kolon anastomozlarında olumlu etkisi saptanırsa, kolon rezeksiyonu yapılan sepsisteki kritik hastalara sadece primer anastomoz yapılarak uygulanan cerrahi tedavi yönteminin kullanılması mümkün olabilecek. Böylece stoma oluşturulması önlenmiş ve stomanın ve stoma kapatmanın ortaya çıkarabileceği potansiyel komplikasyonlar engellenmiş olacaktır.

## GENEL BİLGİLER

### Sepsis

Sepsis, enfeksiyona karşı verilen sistemik inflamatuvar cevaptır<sup>24</sup>. Sepsis ve onun sekeli ilerleyici evreler içerir; endojen mediatörlerle oluşturulmuş enfeksiyona sistemik cevap organlarda genel inflamatuvar reaksiyona neden olabilir ve uç-organ disfonksiyonu veya yetmezliğine yol açabilir<sup>25</sup>. Sepsis önemli ve hayati tehdit eden bir problemdir. Yoğun bakım ünitelerindeki ölümlerin en sık nedenidir<sup>26</sup>. Kronik hastalıkları nedeni ile hastanede yatmakta olan ve tedavi alan hastalarda sepsis insidansı ve mortalitesi daha yüksektir<sup>25-29</sup>. Sepsis ile ilgili olarak bir tanımlar grubu önerilmiştir. Buna göre;

**Bakteriemi:** Kan dolaşımında bakterinin bulunmasına denir.

**Sepsis:** Bakteri veya diğer patojenlerin kan dolaşımına geçmesi sonucu gelişen sistemik bir cevaptır. Enfeksiyon etkeninin kan kültürü ile kanıtlanmış olması gerekir. Sepsiste, enfeksiyonun klinik belirtisi ile birlikte enfeksiyona karşı sistemik cevabın belirtisi olan aşağıdakilerin hepsinin olması gerekir.

-Vücut ısısı  $> 38^{\circ}\text{C}$  veya  $<36^{\circ}\text{C}$

-Kalp hızı  $>90/\text{dak}$

-Solunum hızı  $>20/\text{dak}$  veya  $\text{PaCO}_2 <32 \text{ mmHg}$

-Beyaz küre  $>12.000$  ,  $<4.000$  veya  $>\%10$  genç (çomak) hücrelerin olması.

**Sepsis sendromu:** Hipertermi veya hipotermi, taşikardi, takipne ile birlikte yetersiz organ perfüzyonu belirtilerinden olan aşağıdaki belirtilerden bir veya daha fazlasının bulunmasıdır.

- Hipoksemi ( $\text{PaO}_2 <75 \text{ torr}$ ),

- Serum Laktat yüksekliği,

- Oligüri  $<30 \text{ ml}/1 \text{ saat}$ ,

-Mental değişiklikler

**Ciddi sepsis:** Sepsis ile birlikte aşağıdakilerden birisinin olmasıdır.

-Organ fonksiyon bozuklukları

-Hipoperfüzyon bulguları (Laktik asidoz, oligüri, akut mental değişiklikler)

-Hipotansiyon

**Septik Şok:** Sepsis sendromuna sahip olan ve yeterli sıvı perfüzyonuna (en az

500 ml serum fizyolojik) rağmen, hipotansiyonun diğer nedenleri olmaksızın, sistolik kan basıncının <90 mmHg veya önceki düzeyden 40 mmHg dan fazla düşmesi ile ortaya çıkan tabloya septik şok denir. Sıvı tedavisi veya vazopressör tedaviye cevap vermeyen ve 1 saatten daha fazla süren septik şoka dirençli septik şok denir.

**Sistemik İnflamatuvar Cevap Sendromu (SIRS) :** Sepsis veya sepsis sendromu gibi enfeksiyöz olabilen klinik durumlardan başka, ateş ve organ perfüzyon yetersizliğinin olduğu pankreatit, yanık, iskemi ve doku zedelenmesi gibi enfeksiyöz olmayan nedenleri de içine alan geniş kapsamlı bir klinik durumdur. Bu durumda aşağıdakilerden iki ya da daha fazlasının bulunması gerekir, ancak kan kültürü pozitifliği şart değildir. Çünkü enfeksiyöz olmayan durumlar da söz konusudur.

- Vücut ısısı > 38 °C veya <36 °C
- Kalp hızı >90/dak
- Solunum hızı >20/dak
- Beyaz küre >12.000 , <4.000 veya > %10 genç (çomak) hücrelerin olması.

#### **Sepsiste Klinik**

Sepsis sendromuna neden olan Gram (+) ve (-) sistemik bakteriyel enfeksiyonun en yaygın belirti ve bulguları şunlardır:

- Ateş
- Titreme
- Hipotermi
- Hiperventilasyon
- Deri lezyonları
- Mental durumda değişiklik

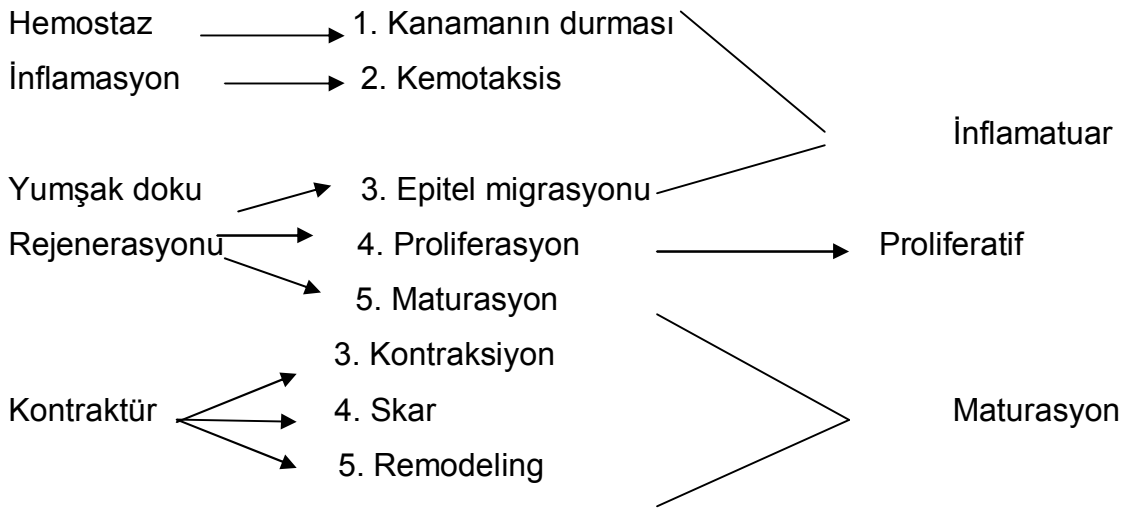
Septik hastalıklar bütün yoğun bakım hastalarının %50'sinden fazlasını etkileyen yoğun bakım ünitelerindeki yaygın komplikasyonları temsil etmektedir<sup>30-32</sup>. Klinik çalışmalarda sepsis ve septik şoktaki hastaları %70-80'inde belirgin şekilde artmış plazma endotoksin seviyeleri tespit edilmiştir<sup>33-35</sup>. Sepsis ve İntraabdominal sepsis kolon anastomozu iyileşmesini olumsuz yönde etkilemekte ve anastomoz kaçağı için risk oluşturmaktadır<sup>36,37</sup>. Sepsisin bu etkisini açıklayabilmek için çeşitli mekanizmalar ileri sürülmüştür. Septik koşullarda kollajen metabolizması yıkım yönünde bozulmaktadır ve septik koşullarda yapılan bağırsak anastomozu

iyileşmesinin en başından beri olumsuz yönde etkilendiği ve bunun da anastomoz kaçağı için risk oluşturduğu ileri sürülmüştür<sup>38,39</sup>. Bir başka deyişle bakterilerin salgıladıkları kollajenolitik enzimler de kollajen yıkımını arttırmaktadır<sup>40</sup>. Ayrıca inflamatuvar yanıtta oluşan nötrofil, serin proteaz ve serbest oksijen radikalleri kolon anastomozu iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir<sup>41</sup>.

### Yara İyileşmesi

Yara, canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel devamlılığının bozulmasıdır. Yara iyileşmesi ise, travma ile başlatılan hücresel ve biyokimyasal olayların yeni doku teşekkülü ile sonuçlanmasıdır.

Yaralanmaya organizmanın verdiği ilk yanıt koagülasyondur. Koagülasyon stabil fibrin oluşumu ile sonuçlanan reaksiyonlar zincirinden oluşmaktadır. Yara iyileşmesinde 3 evre belirlenmiştir. 1.İnflamatuvar evre, 2.Proliferatif evre (Fibroblastik evre), 3.Maturasyon evresi (Remodeling evresi).



**Şekil 1.** Yara iyileşmesi süreklilik diyagramı<sup>42</sup>.

### 1.İnflamatuvar Evre

Yara iyileşmesinin başlangıç basamağı olan akut inflamasyon, hemostazın sağlanması, immün sistem komponentlerinin göçü, mekanik, bakteriyel ve kimyasal etkilere karşı cevabın oluşmasını sağlar<sup>43</sup>. Bu evrede, trombositler başlangıç trombüsünü oluşturup, mediatörler ve growth faktörleri salgırlar. Bu mediatörler nötrofil ve makrofajlar için kemotraktan görevi görürler. Yara alanına gelen nötrofil ve makrofajlar nekrotik doku, debris ve bakterilerin ortamdan

uzaklaştırılmasını sağlarlar<sup>44</sup>. İnflamatuvar evrede, yara oluşumu ile başlayan uyarıya karşı vasküler ve hücresele yanıt oluşur<sup>45</sup>.

**Vasküler Yanıt:** Doku travması ile görülen kanamaya ilk vasküler yanıt, 5-10 dakika süren geçici vazokonstrüksiyondur<sup>43</sup>. Bu süre içinde hemostaz sağlanır<sup>45</sup>. Yaralanma ile koagülasyon mekanizması aktive olur, trombosit adezyonu ve agregasyonu sonucu pıhtı meydana gelir. Agregat olan trombositlerin, granüllerindeki içerik boşalarak, kemotaktik, vazoaaktif mediatörler ortama salınır<sup>43</sup>.

Trombositlerin alfa granüllerinden:

- Fibrinojen
- Fibronektin
- Platellet faktör 4
- TGF- $\beta$
- PDGF
- Tx A2
- Biojenik aminler
- Prostoglandinler salınır.

Geçici vazokonstrüksiyonu takiben aktif vazodilatasyon fazı görülür; böylece kapiller permeabilite artar. Bazı aktif substanslar; mast hücrelerinden salınan histamin, serotonin, bradikinin ve prostaglandinler, mikrosirkülasyonda permeabiliteyi arttırmaları ve venüllerin dilate olmasını sağlarlar<sup>43</sup>. Erken permeabilite değişiklikleri ve vazodilatasyonda asıl etken maddenin histamin olduğu düşünülmektedir<sup>45</sup>.

Vazodilatasyon 72 saat boyunca sürmektedir. Permeabilite artışı ile inflamasyon bulguları görülür. Plazma ve hücre göçünden dolayı bölgede ödem ve bunun sonucunda oluşan doku basıncı artışından dolayı da ağrı olur<sup>43</sup>.

Aktif trombositler, kinin ve kompleman sistemi komponentleri, prostoglandinlerden salgılanan hemostatik faktörler, hücresele kontrol sinyallerini oluştururlar<sup>45</sup>. Bu hücreler tarafından salgılanan mediatörlerin etkisiyle inflamatuvar hücre göçü başlar<sup>45,46</sup>.

**Hücresele Yanıt:** İnflamatuvar evrede hücresele yanıt, vasküler değişikliklerin görülmesinden sonra kısa bir süre içinde başlar. Yaralanmadan birkaç saat sonra, nötrofiller damar duvarlarından diapedesis yolu ile ilerleyerek yara alanına doğru göç ederler<sup>43</sup>. Nötrofil veya polimorfonükleer lökositler (PMNL) ve mononükleer

(MNL) hücrelerin yara yerine göçü dolaşımdaki sayıları ile doğru orantılı olarak gerçekleşir<sup>45</sup>. Nötrofil sadece birkaç saat inflamasyon sahasında kalır. Görevleri yabancı cisim ve bakteri fagositozudur<sup>46</sup>. Yeterli oksijen desteği ile lizis fonksiyonlarını yerine getirirler. Bu işlemlerin sonucunda inflamasyon sahasında oksijen radikalleri meydana gelir<sup>46</sup>. Yara bölgesinde yabancı cisim ve enfeksiyon olmadığı takdirde, nötrofil sayısı hızla azalır, hidrolitik enzimleri hücre dışına yayılır. Eğer ortamda bakteri ve yabancı cisimler varsa inflamatuvar proses devam edecektir<sup>43</sup>. Bakteri ve nekrotik dokuları dijesyonundan sonra parçalanan nötrofilden, hidrolitik enzimler açığa salınır, yara yerinde eksudasyon meydana gelir<sup>46</sup>. Yara yerine ilk göç eden PMNL'in sayısı başta MNL'den daha fazladır; inflamasyon uzadıkça hayat süreleri kısa olan PMNL'lerin yerini MNL'ler alır ve dominant hale geçerler<sup>45</sup>. Nötrofilden sonra yara yerine lenfositlerin göçü olur. Lenfositler lenfokinleri salgırlar. Lenfokinlerin yara yerindeki endotel hücreleri ve hücrelerin kemotaksisi üzerinde etkileri vardır. Yapılan çalışmalar sonucunda, yara yerine göç eden lenfositlerin iki farklı sınıf olduğu gösterilmiştir. İlk sınıfta all-T-cell marker (OKT-1) taşıyan T hücre grubudur; başarılı yara iyileşmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir ki eksikliğinde yara iyileşmesinde bozulmalar saptanmıştır. İkinci sınıf T sitotoksik ve supressör grubudur. Bu grup yara iyileşmesinde düzenleyici rol oynar ve eksikliğinde yara gerilme direnci azalır<sup>46</sup>.

Makrofajların yara yerine göçü ve yara alanındaki sayılarının artışı başlar. Makrofajların önceden sadece fagositik fonksiyonları olduğu düşünülürken bugün yara iyileşmesinde merkezi bir hücre rolü oynadıkları gösterilmiştir. Bu role sahip olmasının en önemli nedeni salgıladığı growth faktörlerdir<sup>46</sup>.

Aktif makrofajlarda salınan growth faktörler:

- TGF $\beta$  - Transforming growth faktör beta
- PDGF -Platellet derivated growth faktör
- IL-1 - İntelökin 1
- PAF - Platellet activated growth faktör
- TGF $\alpha$  -Transforming growth faktör alfa
- TNF - Tümör nekroz faktörü
- FGF - Fibroblast growth faktör
- EGF - Epidermal growth faktör

Makrofaj, bu özellikleriyle yara iyileşmesinin inflamatuvar evresinin orkestra şefi görevini görür. Fibroblast ve diğer mezenkimal hücreler için growth faktör kaynağıdır, neovaskülarizasyon için anjiogenik faktörlerin kaynağıdır, konnektif doku matriks proteinlerinin üretimine yardımcı olur<sup>44,46</sup>.

## **2.Proliferatif (Fibroblastik) Evre**

Yaralanmadan sonraki iki ile üçüncü gün arasında başlayarak, ortalama olarak 3 haftada sonlanır<sup>43-45</sup>. 72. saatte makrofajlardan salgılanan TGF- $\beta$ , fibroblastları yaraya doğru harekete geçirir ve proliferatif evrenin başlangıç sinyalini oluşturur. Makrofajlardan salgılanan diğer growth faktörler ve sitokinler bu evrede anjiogenezi stimüle ederler.

Proliferasyon evresini iki alt başlıkta inceleyebiliriz<sup>46</sup>

1.Fibroblast proliferasyonu

2. Angiogenezis

### **Fibroblastik Proliferasyonu**

Fibroblastlar, makrofajlar tarafından salgılanan bir kemoatraktan olan TGF- $\beta$  etkisi ile yara alanına göç etmeye başlarlar<sup>44</sup>. Fibroblast, yara yakınındaki konnektif doku hücrelerinden köken alır. Birinci haftanın sonunda, yara yerindeki predominant hücre olur. Fibroblastların yara yerine göç etmesi ve fonksiyonlarını yerine getirmesi yeterli oksijen seviyeleri ile ilişkilidir<sup>46</sup>. Fibroblast, yara iyileşmesi için gerekli maddeleri üretir, bunlar: glikozaminoglikanlar ve kollojen lifleridir.

### **Glikozaminoglikanlar(GAG)**

Tekrarlayan disakkarit ünitelerinden oluşan protein çekirdektir. İlk sentez edilen GAG hyaluronik asittir; bunu kondroidin-4-sülfat, dermatan sülfat, heparan sülfat izler<sup>45</sup>. Fibroblastlar ve diğer mezenkimal hücrelerden salgılanan GAG, proteoglikan ve mukoproteinler tarafından, amorföz jel karakterli ground substance oluşumu sağlar. Yara yerinde oluşan bu madde kollajen liflerinin agregasyonunda görevlidir<sup>45,46</sup>. Yeni kollojen lifleri ve hücrelerin organizasyonunun sağlanmasında destek görevi görür; kollajen liflerinin oryantasyonu ve boyutlarının kontrolü ile ilişkilidir<sup>46</sup>.

### **Kollajen Sentezi**

Skar dokusunun major komponenti kollajendir. Yetersiz skar oluşumu yapısal bütünlüğün kaybından dolayı, morbidite ve mortalitenin artışı ile sonuçlanabilir. Tersine aşırı skar oluşumu ise görünüş ve fonksiyonellik açısından

istenmeyen sonuçlar doğurur<sup>44</sup>. 18 adet gen ürününün düzenlenmesi sonucunda 3 halkalı polipeptit yapısından oluşan yaklaşık 13 çeşit kollajen tanımlanmıştır<sup>47</sup>.

Kollajen molekülü pek çok hücreden sentez edilebilir, fakat en önemli kaynak fibroblasttır. Aktif kollajen üretimi fibroblastların endoplazmik retikulumunda başlar, hücre içinde işlem gördükten sonra prolin ve lizin ile hidroksile olmuş prokollajen halinde salınır. Hidroksilasyon, C vitamini, oksijen, demir ve  $\alpha$  ketoglutarat gerektiren kollajen sentezindeki önemli bir basamaktır<sup>46</sup>. Prokollajen polimerizasyona uğrayarak, tropokollojen formunu oluşturur. Tropokollajen birimlerinin amino ve karboksi terminallerine peptit dizeleri eklenerek kollajen lifleri meydana gelir<sup>45,46</sup>. Kollajen sentezi 2. haftada hızlanır, birikimi 2. ve 3. haftalarda en yüksek seviyededir, 3. hafta sonunda sentez ve yıkımı dengededir, 4. haftadan sonra sentezi azalır<sup>44,46</sup>.

Normal deri %80 Tip I kollajen, %20 Tip III kollajen içerir<sup>47</sup>. Yara iyileşme sürecinde biriken kollajen tipleri farklılıklar göstermektedir. Yaralanmadan sonraki ilk saatlerde Tip IV-V kollajen dominant, 24. saatte Tip III kollajen, 60. saatte Tip I kollajen dominant olmak üzere Tip III-IV kollajen birikimi olur<sup>46</sup>.

### **Anjiogenezis**

Yara yüzeyi rölatif olarak iskemiktir, oksijen ve besin transferi olmadan iyileşme gerçekleşemez. Anjiogenez yaralanmadan sonraki 4. günde başlar. Makrofajlar tarafından salınan, endotel ve mezotel hücreleri için kemoatraktan moleküller olan, angiogenik faktörlerin stimülasyonu ile tetiklenir. Endotel hücrelerinin proliferasyonu ile yara yüzeyinde kapiller tomurcuklar oluşur. Bu tomurcuklar ilerleyip, diğerleriyle aralarında yeni bağlantılar oluşturarak, yeni kapiller ağları ve kapiller yatakları inşa ederler. Yaranın metabolik ihtiyaçlarına bağlı olarak, yeni kapillerlerde remodeling ve regresyon olur, bu oluşum skar dokusunun eriteminin azalması şeklinde gözlenir<sup>46</sup>.

### **3.Maturasyon ( Remodeling ) Evresi**

Yaralanmadan sonraki iki-üçüncü hafta arasında başlar, ortalama bir yıl kadar devam eder<sup>43</sup>. Maturasyon evresinde kollajen sentezi devam etmekle birlikte yıkımı da başladığı için net kollajen miktarında artış olmaz<sup>46</sup>. Başlangıçta rastgele dizilmiş olan kollajen lifleri, kademeli olarak mekanik güçlerin etkisiyle organize olurlar<sup>45</sup>. Kollajen lifleri, mekanik kuvvetlerin yarattığı stres hattı boyunca dizilime uğrar ve yarada daha fazla gerilim kuvveti meydana gelir. Yaranın gerilme kuvveti



kollajen miktarından öte, dizilimine bağlı olarak artar<sup>43</sup>. Yaranın gerilme kuvveti hiçbir zaman normal düzeye gelmez, yaralanma öncesi gerilme kuvvetinin ancak %80 ine ulaşabilir.

Kollajen yıkımı kollajenaz enzimi tarafından yapılır. Kollajenaz çinko içeren metalloproteaz bir enzimdir; matur kollajenin  $\alpha$  heliks zincirleri arasına girerek yıkımı gerçekleştirir. Diğer proteazlar da kollajen yıkımında görev alırken, Tip I, II, III kollajeni yıkan major enzim kollajenazdır<sup>46</sup>.

Maturasyon evresinde depolanan yeni kollajen lifleri stabil çapraz bağlar kurarak kalıcı hale gelirler. Kollajen çapraz bağları yaraya direnç ve bütünlük kazandırır. Komşu kollajen lifleri arasında da çapraz bağlar oluşur ve 3 boyutlu triple heliks yapısını kazanır<sup>43</sup>.

Maturasyon evresinde diğer değişiklikler, interselüler matriks moleküllerinde olur. Hyaluronik asit, kondroidin-4-sülfat gibi GAG'ların ve proteoglikanların miktarı dermiste bulunan normal düzeylerine iner, dokuların su içeriği kademeli olarak azalır normale döner<sup>45</sup>. Kollajen kalınlaşır ve yoğunlaşır, kan damarları giderek konstrükte olup kaybolur<sup>43</sup>.

### **Yara Direnci**

Yaraya direnç kazandıran ana madde kollajendir. Yaranın erken evrelerinde direnç kazanma özelliği fibrin pıhtı sayesinde oluşur. İlk 24 saatte yaranın ölçülebilir miktarda gerilim direnci kazandığı, sonuç olarak bu direnci epitelizasyon ve fibrin pıhtı sayesinde kazandığı gösterilmiştir. PMNL'in kollajen formasyonunda yeri olmadığından, inflamasyon evresinde kollajen depozisyonu çok azdır<sup>43</sup>. Ancak makrofajlardan salınan growth faktörler kollajen formasyonunu etkileyerek, indirek yoldan yara direncine katkıda buldukları gösterilmiştir<sup>44</sup>. Çalışmalar sonucunda, yara yerindeki makrofajların sayısının azalması ile kollajen depozisyonunun azaldığı belirlenmiştir<sup>43</sup>. Prostaglandinlerin bu mekanizmada önemli rol oynadığı gösterilmiştir bu nedenle inflamasyonun kontrolünde prostoglandin inhibitörlerinin kullanılması önerilmiştir<sup>43</sup>.

Yara direncinin anlaşılmasında iki önemli birim ifade.

-Gerilim Direnci (Tensile Strength)

-Açılma Direnci (Breaking Strength)

**Gerilim Direnci:** Yara bölgesinin her bir ünitesine uygulanan yüke karşı koyabilen direnç kapasitesidir<sup>45,46</sup> ( $\text{kg/mm}^2$ ). Yara oluşumundan sonraki ilk üç

günde yara kavitesini dolduran fibrin pıhtı ve epitelizasyon sayesinde kazanılan gerilim direnci 3-30 gün arası kollajen sentezi artışı ile korele olarak artar. Yara yeri 2. haftada, sağlam deri direncinin %10'unu kazanmıştır. Bu oran 3-4. haftalarda %25 olup, 8. haftada en yüksek düzeydedir<sup>45,46</sup>. Yara iyileşmesi tamamlandıktan sonra, yara bölgesi hiçbir zaman sağlam deri gerilim direncinin tamamını kazanamaz. Aylar sonra ölçülen değerlere göre optimal şartlarda dahi gerilim direnci %70-80 düzeyine ulaşır. Ancak bireyler arası farklılıklara, yaranın olduğu dokunun özelliğine ve diğer etkenlere bağlı olarak kazanılan gerilim direnci düzeyi değişebilir<sup>45</sup>.

**Açılma Direnci:** Yara kenarlarının ayrılmasına neden olan güç birimidir<sup>46</sup>.

### **Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler**

Yara iyileşme hızı her evresinde farklı etkenler tarafından düzenlenir. Sistemik, lokal veya çevresel faktörlerin yara iyileşmesine olumlu veya olumsuz yönde etkileri gösterilmiştir<sup>45</sup>.

Bu faktörlerden en önemli ve sıklıkla karşılaşılanları:

- Hasta yaşı
- Hastanın beslenme durumu
- Çevre sıcaklığı
- Sigara kullanımı
- Yaranın oksijenizasyonu
- Hemoglobin–hemotokrit seviyesi
- İmmünosüpresyon
- Kortikosteroid
- Mekanik stres
- Enfeksiyon
- Radyoterapi
- Herediter hastalıklar
- Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar
- Vitaminler (A, C, E)
- Mineraller ve aminoasitler (Çinko, Bakır, Arginin)
- Serbest oksijen radikalleri
- Growth Faktörler (TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , PDGF, EGF )

**Hastanın Beslenme Durumu:** Yara hızlı metabolizmasından dolayı yüksek miktarda besin öğelerine ihtiyaç duyar. Malnutrisyon herhangi bir besin öğesinin eksikliği veya ciddi stres katabolik bir süreç yaratır ve yara iyileşmesini negatif yönde etkiler. Yara iyileşmesinde özellikle karbonhidrat ve yağların görevleri iyi bilinmektedir. Glukoz lökositlerin enerji kaynağıdır ve yağlar yeni hücrelerin sentezi için gereklidir. Serum protein düzeyi 2 gramın altında olan kişilerde inflamatuvar evre uzamış ve fibroplazi azalmıştır. Esansiyel aminoasitler inflamasyon ve fibroblast ürünlerinin üretiminin artırılması için gereklidir. Vücut ağırlığının %10'unun veya daha fazlasının kaybı yara komplikasyonlarını artırır.

**İmmünoşüpresyon:** Sıklıkla kemoterapötik ajanların kullanımı nedeniyle oluşan, immünoşüpresyon nedeniyle nötrofil fonksiyonları bozulur. Dolaşımda seviyesi düşen nötrofilin yara yerine ulaşan sayıları azalır. Yara enfeksiyon olasılığı artar, yara iyileşmesi yavaşlar. Yapılan çalışmalar sonucunda kemoterapötik ajanın kullanımından 2-3 hafta geçtikten sonra oluşan yaralarda iyileşmesinde bir gerileme olmadığı görülmüştür.

**Enfeksiyon:** Enfeksiyon olduğunu söyleyebilmek için, patojen bakteri miktarının her gram doku ünitesine düşen miktarı  $10^5$ 'in üzerinde olmalıdır. Ancak beta-hemolitik streptokoklarda daha az sayı ile enfeksiyon oluşabilir. Enfeksiyon, yara iyileşmesinde bozulmalara yol açar. Doku oksijen basıncını düşürür, kollajenolizi artırır ve inflamatuvar evrenin uzamasına neden olur. Bakteriyel kolonizasyon epitelizasyon ve anjiogenezisi azaltır. Bakteri metabolit ve toksinleri epitel migrasyonunu bozar, dermisteki polisakkarit ve protein yapıları etkiler. Enfekte yaralarda granülasyon dokusu daha ödematöz, hemorojik ve frajildir. Bakteriyel kontaminasyon ile artan kollajenolitik aktivite sonucunda yara gerilim direnci düşer ve yara kontraksiyonu azalır.

### **Aminoasitler**

**Arjinin:** Esansiyel bir aminoasit olan arjinin, kollajen depozisyonunu artırarak yara gerilim direncine katkıda bulunur. Arjinin, kollajen üretimi için gerekli olan prolin ve hidroksiprolinin metabolik prekürsörü ornitinin bir ürünüdür. Arjinin growth hormon salınımını stimüle eder ve yara iyileşmesini hızlandırır.

**Serbest Oksijen Radikalleri:** Oksijenin redüksiyonu sonucunda yüksek reaktif ve sitotoksik serbest radikaller meydana gelir. İnflamasyon, iskemi, radyasyon ve kimyasal ajanlar serbest oksijen radikalleri oluşumuna neden olurlar.

Ekstraselüler matrikse salgılanan bu radikaller hücreye zarar verirler. Radikaller hyaluronik asit ve kollajeni, hücre membranlarını yıkar, organel membranlarını parçalayıp, önemli enzim sistemlerinin işlevini bozarlar. İntraselüler serbest radikallerin artışı; yaşlanma, hiperoksijenasyon sendromu, iskemi-reperfüzyon sendromu, kimyasal ajanlarla olan doku yaralanmaları, ilaca bağlı hemolitik anemi ve vitamin A ve E eksikliklerinde görülür.

### **Gastrointestinal Sistemde Yara İyileşmesi**

Gastrointestinal sistem yara iyileşmesinde de yine lokal ve sistemik faktörler etkilidir. Anastomoz iyileşmesi de vücudun herhangi bir yerindeki yara iyileşmesine benzer fazlardan oluşmaktadır<sup>48-50</sup>.

**Faz I. İnflamatuvar Faz (0-3 gün):** Yarada hemostaz lokal vazokontrüksiyon ile başlar. Sonrasında trombosit tıkaç oluşur. Ortaya çıkan vazoaktif maddeler vazodilatasyon ve kapiller permabilitede artışa yol açar. Yaralanma alanında plazma sızıntısı ve ödem oluşur. Yaraya göç eden polimorflökositler (PMNL)in ilk 48 saat sayıları giderek artar. Lökositler lizise uğrayarak stoplazmik granüllerini boşaltırlar. Bu nekrotik dokunun enzimatik olarak parçalanıp makrofajlarca fagositozunu kolaylaştırır. İlk 24 saatten sonra monositlerin sayısı artmaya başlar ve 48 saat sonunda PMNL ile sayıları eşitlenir. Yara yakınındaki konnektif doku hücrelerinden köken alan fibroblastlar ortaya çıkar<sup>48-50</sup>.

**Faz II. Proliferatif Faz (3-14 gün):** Fibroblast, yara iyileşmesi için gerekli maddeleri üretir, bunlar; glikozaminoglikanlar ve kollojen lifleridir. Makrofajlardan salınan sitokinler angiogenezi başlatır. 5-20. günlerde yara gerilme kuvveti hızla artar<sup>48-50</sup>.

**Faz III. Maturasyon (Remodeling) Fazı (14-180 gün) :** Yaradaki hücre sayısı azalır. Organize olan kollojen fibrilleri avasküler skar dokusuna dönüşür. Yara gerilim kuvveti artmaya devam eder ama hiçbir zaman normal seviyeye ulaşmaz<sup>48-50</sup>.

### **Gastrointestinal Sistemde Yara İyileşmesinin Mikroskopik Bulguları**

Gastrointestinal sistemin her kısmında yara iyileşmesi kendine özgü farklılık gösterir. Mide ve ince barsakların kanlanması çok iyi olup bakteri içeriği de azdır. Bu nedenle bu organların rezeksiyonu ve primer anastomoz sonucu kaçak çok az görülmekte ve bir hafta içinde anastomoz yeterli sağlamlığa ulaşmaktadır.

Kolonik anastomoz iyileşmesi daha yavaştır. Anastomoz iyileşmesi başka bir yerdeki yara iyileşmesi gibi inflamasyonla başlar. Anastomozdan 3 saat sonra granüositler bölgede belirir ve ilk 24 saat dolduğunda maksimum düzeye ulaşır. 24-48 saat sonunda yerini monosit ve makrofajlara bırakır. İntestinal anastomozlarda PMNL bir haftada kaybolurken kolon anastomozlarında bulunmaya devam ederler<sup>48,51</sup>.

Postoperatif birinci haftada lokal vasküler cevap nedeniyle anastomoz alanında intestinal duvar ödemi oluşur. Hem intestinal hem de kolonik anastomoz da 2-3 gün içinde yeni kapillerler ve arterioller oluşur. Postoperatif 3-5. günlerde kolonik anastomozdaki vaskülarizasyon intestinal anastomozlara göre daha azdır<sup>48,50</sup>.

Mukozal tamir ince barsakta kolondan daha hızlıdır. İntestinal anastomozda mukozal defekt bir haftada tamamen iyileşirken kolonik anastomozda daha yavaş iyileşir. Mukozal tamir yara kenarından başlar. Mukozal kriptlerden hücre migrasyonu ve epitelyal hiperplazi ile tamir oluşur. Submukoza intestinal traktın gerilme direncini sağlar. Anastomoz yapılmış barsakta uçları tutan sütürleri sağlamlaştırır<sup>48,52,53</sup>.

Kolonda üç düz kas tabakası vardır. Muskularis mukoza, sirküler ve longitudinal kas tabakaları. Düz kasların kısmen rejenerasyon kabiliyetleri vardır. Sirküler ve longitudinal kas tabakalarında başlangıçta oluşan skar formasyonu takip eden haftalar ve aylar içinde yerini düz kas hücrelerine bırakır. Muskularis mukoza ise farklılaşmamış hücre göçü ile düz kas hücresi oluşturularak tamir edilir. Göç eden düz kas hücrelerinin in vitro olarak kontraktil ve sentetik hücrelere farklılaşma kabiliyeti gösterilmiştir<sup>48,51</sup>.

Seroza, muskularis externayı örten konnektif dokudur. İyi bir serozal oppozisyon sızıntı riskini minimize etmek için gereklidir. Ve inverting sütür tekniğinin kullanılması ile bu başarı ile sağlanabilir. Bu nedenle serozası olmayan retroperitoneal segmentlerde ve serozasız intestinal organ anastomozlarında yüksek komplikasyon riski vardır<sup>48,52,53</sup>.

### **Anastomoz İyileşmesinde Kollajen Metabolizması**

Hidroksiprolin kolonun farklı kısımlarında farklı konsantrasyonlarda bulunur. Ratlarda çekum ve distal kolonda yüksek bulunmuştur. Kolona anastomoz yapılması, anastomoz hattının 2.5 cm proksimalinde ve 0.5 cm distalinde

postoperatif ilk 3 günde kollajeni %20-40 azaltır. Hidroksiprolin konsantrasyonu 3. günde artmaya başlar ve 10. günde preoperatif değerine ulaşır<sup>54</sup>. 3. günde başlayan artış 7. günde maksimum değere ulaşır<sup>55</sup>. Kolon anastomozlarından sonra ilk hafta boyunca kolonun tün kısımlarında kollajen sentezi artar<sup>54,56</sup>.

Cerrahiden sonra 3-4. günde anastomoz alanında kollojen sentezi artar<sup>56</sup>. 7. günde daha aktif olarak (6-10 kat) sentez gözlenir. Aynı anda anastomoz hattının 0.5-1.5 cm proksimalinde 5 kat, 0.5-1.5 cm distalinde 3 kat yüksek aktivite vardır<sup>56</sup>.

Gastrointestinal anastomoz iyileşmesi sırasında kollajen sentezi ve kollajenolizis beraberdır. Ekstrasellüler matriksteki komponentlerin parçalanmasında 2 grup enzim önemlidir. Metalloproteazlar (kollajenaz, gelatinaz, stromelisin) ve plazminojen aktivatör-plazmin görev alır. Proteolitik aktivite geçicidir. Enzimlerin aktivasyonları ve inhibisyonları arasında feedback kontrolü vardır. Kolon anastomozundan sonraki 3. günde kollajenolitik aktivite %145 oranında artar<sup>48,57-60</sup>.

İmmünolojik çalışmalar anastomoz hattının birkaç milimetre uzağında kollagenaz ve inhibitörlerini göstermiştir<sup>61</sup>.

Kolon anastomozlarından sonra kollajen özellikle anastomoz hattı, submukoza, serozal yüzeyde birikir. Submukoza, anastomoz hattı ve düz kas hücreleri bazal laminasında biriken fibronektin iyileşmenin inflamatuvar döneminde azalırken, ilk haftada artmaya başlar. Submukoza ve anastomoz hattında 7. günde maksimum düzeye ulaşır. Normal kolon güçlü aerobik ve anaerobik metabolizmaya sahiptir. Kolonik anastomozda tüm enerji aktiviteleri anastomoz alanında azalır. Bu değişiklikler özellikle mukoza ve müsküler tabakada belirgindir. Fakat submukozal enerji metabolizması bozulmaz.

Anastomoz direncinin belirlenmesi 2 şekilde olmaktadır:

1. Patlama basıncı
2. Gerilme direnci

**1.Patlama Basıncı:** İnvitro şartlarda anastomoz proksimalinden ve distalinden konulan kataterler yardımı ile dakikada belirli bir miktarda sıvı infüzyonu sonrasında anastomoz gerilmesine bağlı gelişen kaçağın gözleendiği maksimum sıvı basıncına patlama basıncı denir<sup>62</sup>(mmHg). Patlama basıncı anastomozdan 2-3 gün sonra azalır<sup>55,62</sup>. İnce barsak anastomozlarında patlama

basıncı %50, kolon anastomozlarında %35-75 azalmıştır. Bir hafta içinde patlama basıncı preoperatif değere eşitlenir<sup>54,61</sup>. Anastomoz patlaması postoperatif 7. günde sıklıkla anastomoz dışı bölgeden olur<sup>51,54,62</sup>. Kolonik duvarda patlama basıncı ve kollajen içeriği arasında ilişki yoktur<sup>62</sup>.

**2. Gerilme direnci:** Yara bölgesinin her bir ünitesine uygulanan yüke karşı koyabilen direnç kapasitesi gerilme direncidir.<sup>45,46</sup> (kg/mm<sup>2</sup>). Gerilme kuvveti postoperatif ilk 4 hafta boyunca anastomoz alanında oluşur<sup>62</sup>. Gerilme kuvveti yeni oluşan kollajen ile ilişkilidir<sup>62</sup>. Tüm gastrointestinal anastomozlarda cerrahi sonrası ilk 3 gün orjinal gerilim azalır. Gerilme kuvvetindeki azalma; özefagusta %4, midede %60, gastroduodenostomide %64, duodenumda %80, ince barsakda %70-80, ileokolostomide %80, kolonda ise %72-95 dir. Gerilme kuvveti patlama basıncından daha geç normale döner. Gerilme kuvveti 10. günde %50 oranında eski değerine ulaşır<sup>62</sup>.

### **Kolon Anastomozu İyileşmesini Etkileyen Faktörler**

Genel olarak yara iyileşmesini etkileyen tüm faktörler kolon anastomozu iyileşmesini de etkiler. Ek olarak ;

1. Cerrahi teknik
2. Ameliyat öncesi barsak hazırlığı
3. Anastomoz kanlanması
4. Lokal enfeksiyon
5. Hastanın mevcut hastalığı

**1. Cerrahi teknik:** Uygun olmayan cerrahi teknik erken dönemde anastomoz kaçağına neden olmaktadır. Postoperatif 1-3. günler arası anastomoz sağlamlığını sağlayan en önemli etken sütürlerdir. Kollagen konsantrasyonu çift kat sütürlerde tek kat sütürlere göre daha belirgin azalır<sup>50</sup>. Patlama basıncı her iki sütür tekniğinde de aynıdır. İnverting teknik everting tekniğe göre daha üstün bulunmuştur<sup>50</sup>. Anastomozlarda kullanılan tüm sütür materyalleri yabancı cisim reaksiyonu ile inflamasyona neden olur. İnflamasyon; stapler ve monofilament sentetik sütür materyali kullanıldığında en azdır. İnflamatuvar reaksiyon sentetik materyale göre katgüt ve ipek kullanımında oldukça fazladır<sup>48</sup>. Polyglycolic asit dışındaki multiflament sütür materyalleri monofilamentlere göre daha fazla yara yeri enfeksiyonuna neden olur<sup>48</sup>.

**2. Ameliyat öncesi barsak hazırlığı:** Elektif kolon cerrahisi öncesi kolon hazırlığı rutin olarak yapılmaktadır. Acil şartlarda kolon hazırlığı olmadan yapılan anastomozlarda kaçak sıklığı artmaktadır.

**3. Anastomoz kanlanması:** Normal anastomoz iyileşmesi için kanlanma ve oksijenizasyonun iyi olması gerekir. Eğer PO<sub>2</sub> 25mmHg altında ise fibroblast proliferasyonu durur. 20 mmHg altında ise enerji metabolizması bozulur<sup>48</sup>.

Moleküler oksijen; intramoleküler çapraz bağlar ve molekülün son şekli için gerekli olan kollajendeki lizin ve prolin hidrosilasyonunda çok önemlidir<sup>48,50</sup>.

Kollajen sentezi kanın oksijen taşıma kapasitesinden ziyade PO<sub>2</sub> ile ilişkilidir. Çünkü orta derece normovolemik anemide dokuya oksijen sunumu ve yara iyileşmesi bozulmaz. Hipovolemi yaraya oksijen sunumunu azaltır ve iyileşmeyi geciktirir<sup>48</sup>. İntraoperatif dolaşan kan volümünün %10'luk kaybı postoperatif 3. günde kolonik ve ileokolik anastomozda anlamlı derecede kollajen azalmasına neden olmuştur<sup>63</sup>.

**4. Lokal enfeksiyon:** Enfekte gastrointestinal anastomozda kollajen birikimi bakteriyel kollajenazlar nedeniyle azalır<sup>38,48</sup>. Preoperatif ve postoperatif antibiyotik tedavisi ve mekanik temizlik histolojik iyileşmeye ve kolonda anastomoz gerilim kuvvetine olumlu olarak etki eder<sup>48,64</sup>.

**5. Hastanın mevcut hastalığı:** Yara iyileşmesini bozduğu bilinen diabetes mellitus gibi sistemik hastalık varlığı, hasta tarafından kullanılan steroid, immünosüpresifler anastomoz iyileşmesini bozar. Ayrıca ileri yaş, beslenme durumunun bozuk olması, malignite varlığı, radyoterapi veya kemoterapi kullanımı anastomoz iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir.

### **Lipopolisakkarit Antijeni (LPS)**

Bakteriye ait LPS Gram-negatif bakterilerin (örnek: E. Koli, salmonella enterika) hemen hepsinde bulunur ve en önemli dış yüzey membran bileşenidir. LPS'nin kimyasal yapısında polisakkarit ve fosfolipit olmak üzere iki alan bulunmaktadır. Polisakkarit alan O-spesifik halka ve çekirdek bölgeden oluşmaktadır. Fosfolipit alan ise lipit A'dan oluşup LPS'nin bakteri duvarına sıkıca bağlanmasını sağlamaktadır ve toplam membran yüzeyinin %75'ini oluşturmaktadır<sup>65-67</sup>. Lipit A bölgesi, memeli türlerindeki endotoksisiteyi belirleyen LPS'nin asıl immünstimülatör merkezini temsil etmektedir<sup>68-70</sup>. LPS insanın da dahil olduğu farklı ökaryotik türlerde doğuştan gelen veya doğal immünitenin çok



güçlü uyarıcıları olarak etki etmektedir. Memeli immün sistemindeki myeloid nesil hücreler LPS'nin asıl hücre sel algılayıcılarıdır. Bu hücreler doğuştan veya doğal immünite fagositleri olan periferel monositler, doku makrofajları, nötrofiller ve dentritik hücrelerdir. Endotoksin, hepatositlerde üretilen moleküler ağırlığı 58 kilodalton olan lipoprotein bağlayıcı protein (LBP) ile birleşir<sup>71,72</sup>. LBP, bir akut faz cevap proteini dir<sup>73</sup>. Bu yapı, monosit, makrofaj, lenfosit gibi hücrelerin yüzeyinde bulunan moleküler ağırlığı 53 kilodalton olan CD14 molekülü ile birleşir<sup>74,75,76</sup>. Konakçı hücrelerdeki CD14 molekülü glikozilfosfoinozitol yapısında bir reseptördür<sup>76,77,78</sup>. Bu birleşme sonucu, hücre içinde bir sinyal yapımı ortaya çıkar, nükleustaki NF-κB aktive olur. TNF-α, IL-8 ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu artar. Oluşan hücre içi sinyalin şiddeti yüksek olup, ortalama 1-20 dakika sürmektedir<sup>79,80,81</sup>. LPS fagositleri, kompleman sistemi gibi humoral serum proteaz kaskadını aktive eder, T ve B lenfositleri uyararak spesifik antikor oluşumuna neden olur. Aktive olan makrofajlardan lipid mediatörler (platelet aktive edici faktör, lökotrien C4, tromboksan A2 ve prostoglandin E2), reaktif oksijen türleri (süperoksit-anyon, hidroksil radikali ve nitrik oksit) ve sitokin/kemokinler (TNF-α, IL-1β, IL-12, IL-18, GM-CSF, IL-10) salgılanmaktadır<sup>82</sup>.

Bu salgılanan mediatörler dengeli fizyolojik düzeylerde olursa fizyolojik etkiler (orta derece ateş, mikroorganizmaların öldürülmesi, antiviral immünstimülasyon ve antitümöral immün aktivasyon), kontrolsüz patolojik düzeyde olursa patolojik sonuçlar (titremeli yüksek ateş, hipotansiyon, yaygın damar içi koagülasyon, tromboz, multiorgan disfonksiyonu, multiorgan yetmezliği ve ölümcül şok) ortaya çıkar<sup>82</sup>. Sitokinlerin etkisi ile septik şokun klinik belirtileri ortaya çıkmaktadır. Hayvan ve insanlarda LPS enjeksiyonunu takiben bütün bu klinik belirtilerin ortaya çıkması, sepsis sendromunda LPS'nin önemini gösteren ciddi bir kanıttır<sup>78,79,83-85</sup>. Bu etkiler haricinde LPS vasküler endotel hücreleri, düz kas hücreleri, epitel hücreleri ve fibroblastları da aktive eder<sup>86-88</sup>. Endotoksin, intrinsek ve ekstrinsek pıhtılaşma yollarını harekete geçirerek, PAF ile trombositleri etkin hale getirerek ve prostaglandin salınımını sağlayarak intravasküler koagülasyona neden olmaktadır. Karaciğer, böbrek, gastrointestinal sistem, akciğer gibi hayati organlarda hücre sel düzeyde olumsuz etkiler yapmaktadır. Karaciğerde hepatosellüler nekroz odaklarına, trombozise, hidropik ve vaküoler dejenerasyonlara, sinüzoidal ve portal inflamasyonlara yol açmaktadır<sup>89-98</sup>.

Endotoksemiden 6 saat sonra pulmoner makroskopik hemorajiler görülür. Ayrıca pulmoner damarlarda mikrotrombüsler, lenfosit, nötrofil ve makrofaj infiltrasyonu endotoksine bağlı olarak saptanan diğer histolojik bulgulardır<sup>99</sup>. Ratlara parenteral endotoksin uygulanırsa, gastrik erozyonlar ve submukozal hemorajiler ortaya çıkar<sup>92</sup>. Endotoksin kökenli gastrik erozyonların histolojik incelemelerinde, mukozal damarlarda mikrovasküler fibrinöz mikrotrombüsler gözlenir<sup>94-102</sup>.

Endotoksinin etkilediği bir diğer organda böbreklerdir. Endotoksin böbreklerde vazokonstriksiyon yapar, kan akımını korteksten medullaya doğru kaydırır, intravasküler trombozise neden olup peritübüler fibrin depolanmasına yol açar<sup>81,95,98-102</sup>.

LPS uygulama yoluna ve dozuna bağlı olarak mikrobiyal ve viral enfeksiyonlara, neoplastik hastalıklara karşı genel immün direnci artırabilmekte, antijene spesifik immün yanıtı güçlendirmekte veya Gram-negatif bakteriyemi ve endotoksemiye bağlı sepsisin ciddi patolojik semptomlarını ortaya çıkarabilmektedir<sup>30-32,103</sup>. LPS Gram-negatif bakteri enfeksiyonları için mükemmel bir model maddedir ve bakteriyel enfeksiyonları taklit etmek ve onların immün uyarıcı fonksiyonlarını değerlendirmek için kullanılmaktadır<sup>104</sup>. LPS uygulaması ile septik peritonit, sepsis ve septik şok oluşturulabilmekte, sistemik inflamatuvar yanıt, multiorgan disfonksiyonu ve ölüm oluşabilmektedir<sup>104</sup>.

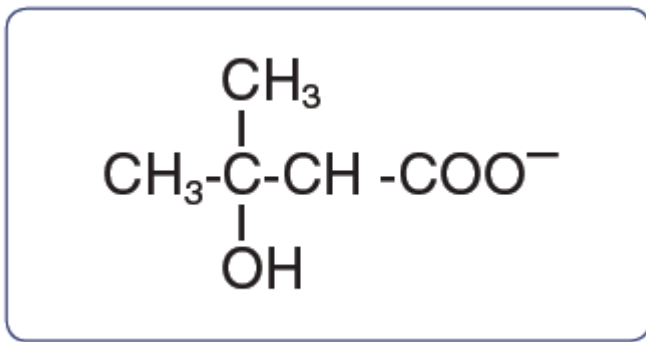
### **HMB ( $\beta$ – hidroksi $\beta$ – metilbutirat)**

HMB esansiyel dallı zincirli bir aminoasit olan lösin metabolitidir. HMB aynı zamanda avokado, narenciye, karnıbahar, yonca ve anten balığı gibi bazı bitki ve hayvanlarda da bulunmaktadır. HMB'nin ticari olarak üretilen kalsiyum HMB monohidrat (CaHMB) şeklinde besin desteği formu mevcuttur<sup>18</sup>. İnsan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki HMB protein sentezini artırmakta, protein yıkımını ise azaltmaktadır<sup>19</sup>. HMB atletler tarafından bu nedenle performans geliştirici ve kas kitlesini arttırıcı madde olarak da kullanılmaktadır<sup>19</sup>. Yakın zamanda yapılan araştırmaların çoğu, yağsız vücut kitlesi (YVK) kaybı olan insanlarda HMB'nin kullanımının hasar, sakatlık ya da mortalite üzerine olan etkileri konusunda yoğunlaşmıştır. Bu araştırmalara göre, YVK kaybı olan yaşlı ve AIDS/kanser gibi kronik hastalığı olan insanlarda, diğer aminoasidlere göre HMB desteğinin daha faydalı olduğu gösterilmiştir<sup>20-23</sup>.

YVK'nın kaybı, hastalık süreçlerini etkilemekte ve mobilite ile kendine kendine yetebilirlik ile ilişkili olan hayat kalitesini etkilemektedir. Kayıp YVK'nın yerine konması, bu süreçlerin ve hayat kalitesinin iyileştirilmesinde oldukça etkilidir. YVK kaybı olan populasyonlarda, YVK'nın yeniden kazandırılması, morbidite ve mortaliteyi azaltabilecektir<sup>105-109</sup>. Bunun olası mekanizmaları; fiziksel fonksiyonların geliştirilmesi, immün fonksiyonların idamesi ve yara iyileşmesine destek olmak olarak düşünülmektedir. HMB'nin yalnız başına ya da diğer aminoasitlerle birlikte kullanımının, yaşlı bireylerde, AIDS'li hastalarda ve ileri evre kanseri olan ya da kritik durumdaki hastalarda meydana gelen YVK kaybını iyi bir şekilde geriletmediği ve sağlığa olumlu etki ettiğini gösterilmiştir<sup>21-23,110-112</sup>.

HMB, diyetel kaynaklardan elde edilen dallı-zincirli esansiyel bir aminoasit olan lösin'in metabolitidir<sup>113</sup>. Lösin protein sentezinin düzenlenmesini sağlar ve nitrojen dengesinin sağlanmasına yardım eder. Buna ek olarak vücudun protein kullanılabilirliğini arttırmada da indikatör olarak kullanılmaktadır<sup>114,115</sup>. HMB, kas hücrelerinde protein sentezini düzenleyen bir lösin metabolitidir<sup>116</sup>. HMB'nin kas proteolizis'ini inhibe ettiğini ve protein turnover'ını düzenlediğini gösterilmiştir<sup>117-120</sup>.

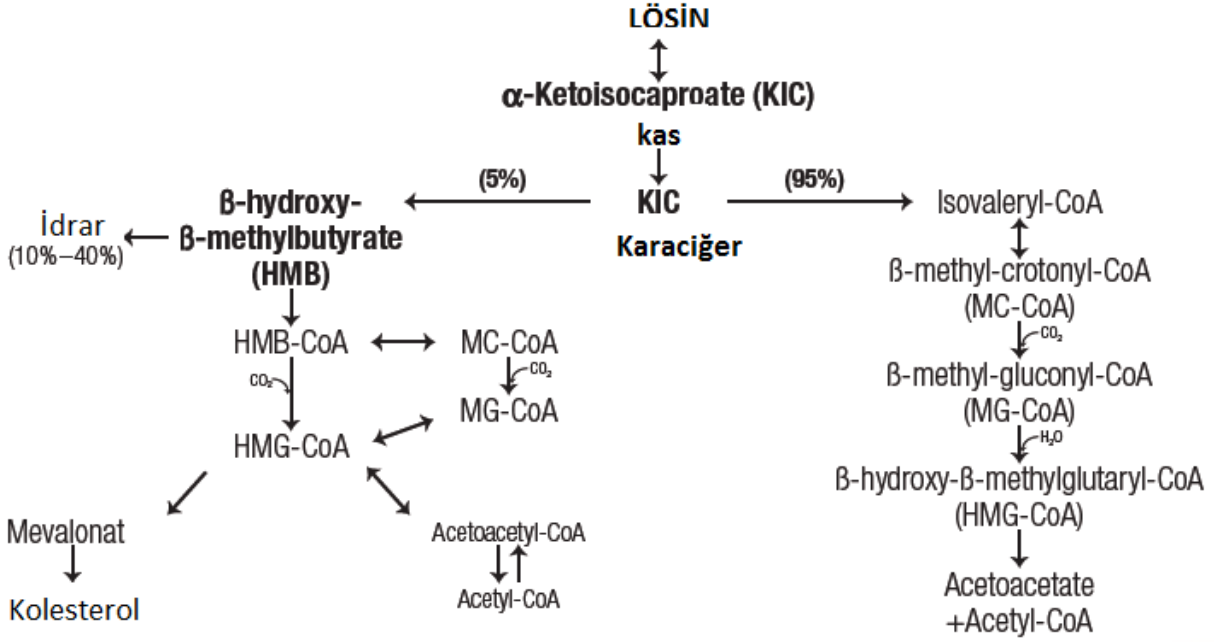
HMB'nin kimyasal formülü C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>'tür [Şekil2]. HMB, ticari olarak üretilmektedir. Organik kimyasal sentez yoluyla üretilen bu HMB, kalsiyum tuzlarının da eklenmesi ile CaHMB monohidrat [Ca(C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O] şeklinde ticari formda piyasada bulunmaktadır.



**Şekil 2.** HMB nin kimyasal yapısı

Lösin metabolizmasında ilk basamak, kas hücrelerinde a-ketoisocaproat'ın (KIC) transaminasyonudur. KIC, kas hücrelerinden salınır karaciğere taşınır. Karaciğerde ise KIC'in büyük bölümü, mitokondri'de izovaleril koenzim-A

(izovaleril-koA)'ya oksidize olur ve daha sonra asetoasetat ile asetil-koA'ya metabolize olur. KIC'in yaklaşık %5'i ise, KIC-dioksijenaz enzimi ile HMB'ye metabolize olur. KIC-dioksijenaz, sitozolik bir enzimdir. Üretilen HMB dolaşıma verilir<sup>121</sup>. (Şekil 3) 70 kg ağırlığında bir insan günde yaklaşık olarak 0,2-0,4 g HMB üretir. Bu miktarda HMB; özellikle stres ve yara iyileşmesi gibi metabolik süreçler için yeterli olmayabilmektedir<sup>121,122</sup>.



**Şekil 3.** HMB'nin metabolizma yolu

HMB bir lösin metaboliti olup, iskelet kası hücrelerinde kolesterol sentezi için bir prekürsördür<sup>121</sup>. Çok aşamalı süreçte HMB, kas hücrelerinin sitozol bölümünde β-hidroksi-β-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) ya dönüştürülür<sup>121</sup>. HMG-CoA, kolesterole dönüştürülür. Kas hücreleri, hücre membranının akışkanlığını idame ettirebilmek için gerekli olan kolesterollerini kendileri üretirler, bunu tipik olarak HMG-CoA'dan elde ederler çünkü dolaşımdan absorbe edilen kolesterolden yararlanamazlar<sup>121</sup>. HMB'nin koruyucu ve anti-katabolik etkili olduğu, ve protein sentezine direkt olarak etki edebildiği gösterilmiştir<sup>19</sup>.

HMB'nin; Kas hücrelerinin membranını stabilize ettiği<sup>121</sup>, protein yıkımını azaltarak etkilediği<sup>123,124,127</sup>, protein sentezini arttırdığı<sup>19,125,127</sup> gösterilmiştir. Tümör

nekroz faktörü-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA), HIV/AIDS ile ilişkilidir ve sözkonusu durumlarda artar<sup>126,127</sup>. Lipopolisakkarid (LPS), KOA ve sepsis durumlarında sinyal faktörü olarak görev alır<sup>126,127</sup>. Proteolizis-ilişkili faktör (PIF), kanserlerde tümör kitlesinden salınır ve dolaşımdaki miktarı artar<sup>124</sup>.

HMB, iskelet kası hücrelerinde protein yıkımını sağlayan 2 ayrı yolağı etkileyerek protein yıkımını azaltmaktadır. Başlangıçları farklı sinyal faktörleri ile oluşsa da, her iki yolak sonucunda da protein yıkımını sağlayan düzenleyici faktör olan nükleer faktör-kappa B (NF $\kappa$ B) aktive olmaktadır. NF $\kappa$ B'nin nükleustaki aktivitesi artmaktadır ve proteinleri yıkan enzimler olan proteozomlar'ın üretimi artar. Sonuçta protein yıkımı artar<sup>124,127,128</sup>.

TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , Angiotensin II ve Lipopolisakkaritler (LPS), kaspaz-8'i aktive eder. Kaspaz-8, hücre membranında yer alan bir protein olup, hücredeki bir diğer protein olan kaspaz-3'ü aktive eder. Kaspaz-3 ve intraselüler diğer proteinler arasında etkileşim sonucunda, nükleustaki protein sentezinde azalma meydana gelir. HMB, kaspaz-8'in aktivasyonunu inhibe eder. HMB, bu inhibisyonu şu yollarla sağlar<sup>127,128,129</sup>; protein sentezinin azalmasını önleyerek, NF- $\kappa$ B tarafından başlatılan protein yıkımının inhibisyonunu artırarak. Bu mekanizmaların sonucunda, hücre membranında kaspaz-8 aktivasyonu azalmış olur. Bu nedenle HMB, protein sentezinin idame ettirilmesinde ve protein yıkımının önlenmesinde oldukça önemli bir rol üstlenmektedir.

Kanser hastalarında, PIF kas hücre membranındaki araşidonik asid'i aktive eder, bu durum da inflamatuvar mediatörlerin hücre stoplazmasında üretilmelerine neden olur. Bu inflamatuvar mediatörler ve intraselüler proteinler arasındaki etkileşim sonucunda NF- $\kappa$ B aktive olur. HMB, araşidonik asit ürünleri ile intraselüler proteinler arasındaki bu etkileşimi bozarak NF- $\kappa$ B'nin aktivasyonunu önler. Bunların sonucunda protein yıkımı azaltılmaya çalışılır<sup>127,128,129</sup>.

HMB, protein sentezini direkt olarak arttırıcı etkiye sahiptir. Bu etki, protein sentezini kontrol eden bir hücre içi proteini olan mTOR (mammalian target of rapamisin-memelilerde rapamisin hedefi) aktivasyonu üzerinden sağlanmaktadır. HMB, mTOR sinyal yolaklarını uygun bir şekilde aktive eder<sup>116</sup>. mTOR yolağı büyüme faktörleri, hormonlar, aminoasidler, glikoz ve stres durumlarında uyarılmaktadır. mTOR, uygun düzeylerde besin maddeleri (glikoz, aminoasid,

lipoprotein, mineral) varlığında aktive olabilmektedir. mTOR, protein sentezi için gerekli olan mekanizmaları ribozomlar üzerinden aktive etmektedir<sup>130</sup>.

İnsülin-benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), mTOR'u kas hücrelerinde aktive eden büyüme faktörlerinden biridir. HMB, mTOR'u ve IGF-1 üzerinden meydana gelen mTOR aktivitesini arttırmaktadır<sup>116,125</sup>. Bu nedenle HMB, büyüme hormonu ve IGF-1 ile ilişkili olarak yaşla ilişkili doku yanıtında meydana gelen azalmayı da önleyebilecektir. Böylece sarkopeni'nin önüne geçilmesi mümkün olacaktır<sup>131,132</sup>.

### **Malondialdehit (MDA)**

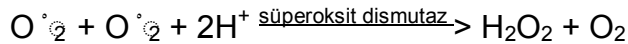
Hidroksil radikalleri hücre ve organel membranlarındaki lipidler ile çift bağ yapar ve oluşan lipid-radikal etkileşimi ile bir dizi reaksiyon gelişir. Bunun sonucunda malondialdehit, dien konjugatları gibi birçok lipid peroksidasyon ürünü oluşur<sup>133</sup>. MDA lipid peroksidasyonun son ürünüdür ve oksidatif hasarın bir indikatörüdür. MDA oluşum yerinden kolayca diffüze olarak membran yapısındaki lipid ve proteinlere çapraz bağlanarak membran bütünlüğünü bozar, bu da membran permeabilitesinin bozulmasına neden olur. Birçok değişik organ sistemleri üzerinde iskemi/reperfüzyon modeli oluşturularak yapılan çalışmalarda MDA düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir<sup>134-136</sup>. TBA reaktivitesi ile MDA ölçümü lipid peroksidasyonun değerlendirilmesi için en sık kullanılan yöntemdir<sup>135</sup>.

### **Miyeloperoksidaz (MPO)**

MPO polimorfonükleer lökosit (PMNL) infiltrasyonunun indeksi olduğu bilinmektedir. PMNL'ler potansiyel serbest oksijen radikalleri (SOR) kaynağı olup oksidatif stres hasarının gelişmesinde majör bir rol oynarlar. Deneysel çalışmalarda MPO düzeylerinin İ/R hasarı, yanık ve sepsis gibi değişik inflamatuvar süreçlerde arttığı gösterilmiştir<sup>138</sup>.

### **Süperoksit Dismutaz (SOD)**

SOD, bir oksidan olan süperoksit radikalinin hidrojenperoksite dönüşümünü hızlandırarak, süperoksit radikalini ortadan kaldırır<sup>139</sup>.



SOD hücrelerde iki şekilde bulunur; birisi primer olarak sitoplazmada bulunur bakır ve çinko ihtiva eder, diğeri de manganez içeren mitokondriyal SOD'dır<sup>140</sup>. SOD, süperoksit anyonların hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizler. Hidrojen peroksit de, glutatyon peroksidaz ve katalaz ile metabolize edilir. Glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz tarafından katalizlenip oluşan

indirgenmiş glutasyonu, okside glutasyon haline dönüştürür<sup>141</sup>. SOD antioksidan etkiye sahiptir.

### **Nitrik Oksit (NO)**

NO renksiz bir gazdır, kısa ömürlüdür ve hücrel üretim yerinin direkt olarak österilmesi mümkün değildir<sup>142,143</sup>. Geniş biyolojik, kardiyovasküler, nörolojik ve immun fizyolojik etkisi olan bir serbest radikaldir<sup>144</sup>. NO'nun oksijenasyonu, nitrit ve nitrat stabil metabolitler oluşması ile sonuçlanır<sup>145</sup>. Nitrik oksit sentaz (NOS)'un üç izoenzimi tarafından üretilir, iki tipten oluşur; kalsiyum bağımlı tip(endotelial ve nöral, ikisi bir cNOS'dur) diğeri de kalsiyum bağımsız tiptir ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) olarak bilinir<sup>146</sup>.

iNOS oluşumu proinflamatuvar sitokinlere ve çeşitli hücrelerden (nötrofiller, monositler, makrofajlar, T lenfositleri, vasküler düz kas hücreleri ve lenfositler) bazı bakteriyel ürünlerin salınımı ile oluşur. Ancak, insan inflamatuvar hücrelerinden NO salınımı için ihtiyaç duyulan şeyler halen tartışmalıdır<sup>147</sup>. LPS ile indüklenen sepsis dahil immun veya inflamatuvar değişiklikler iNOS'u bağırsakta indükler<sup>148</sup>. iNOS, cNOS'tan daha büyük miktarlarda nitrik oksit salar<sup>149</sup>. NO sepsis esnasında veya mukozal enfamasyon esnasında sitotoksik düzeye ulaşır<sup>150</sup>. NO fibroblast fonksiyonunda ve kütanöz yara kollejeni sentezinde önemli ancak tam olarak anlaşılmamış bir rol almaktadır. iNOS gene ekspresyonu kolon yara iyileşmesinde uyarılmaktadır ve iyileşmenin bütün fazlarında bulunmaktadır, iNOS aktivitesi optimal iyileşme için gerekmektedir<sup>151</sup>. iNOS kolon anastomozu iyileşmesinde negatif etkilidir; sepsiste iNOS artar ve sonucunda da anastomozda iyileşme azalır<sup>152</sup>

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deneyisel çalışma protokolü Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nda onaylandıktan (04.01.2012 tarih 2012/44 sayı) sonra deney hayvanları üzerindeki çalışmalar Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmada kullanılan Wistar Albino tipi ratlar MEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Üretim Birimi'nden temin edildi. Çalışmada ağırlıkları 250-320 gr arasında değişen 40 adet erkek rat kullanıldı. Çalışma süresince ratlar 24°C oda ısısında ve 12/12 saatlik gece gündüz siklusunda tutuldu ve kısıtlama yapılmadan standart rat yemi ve su ile beslendi.

### **Sepsis modeli**

Sepsis modeli Diller<sup>15,153</sup> ve arkadaşlarının uyguladığı gibi 2 mg/kg LPS'nin kolon anastomozundan 18 saat önce intraperitoneal olarak verilmesiyle oluşturulmaya çalışıldı.

### **Deney Grupları**

**Kolon Anastomozu (KA) Grubu, (rat sayısı:10):** Ratlara laparotomiden 18 saat önce LPS gruplarına verilecek LPS hacmi kadar miktarda serum fizyolojik (2.27 ml/kg) intraperitoneal (i.p.) olarak verildi. Yine LPS gruplarına sıvı resusitasyonu amacıyla verilecek hacimde (5 ml/kg) serum fizyolojik subkutan (s.k.) olarak deneyin başlangıcında bir kere verildi. Ratlara cerrahi işlem olarak kolon anastomozu yapıldı. Postoperatif dönemde ratların beslenmesine başlandı. Bu grup KA'da ortaya çıkan değişiklikleri göstermek için oluşturuldu.

**Lipopolisakkarit + Kolon Anastomozu (LPS + KA) Grubu, (rat sayısı: 10):** Ratlara laparotomiden 18 saat önce 2 mg/kg LPS (E. Coli 055:B5 serotip SIGMA I-2880; toz halinde temin edilen LPS 8,8 mg/10 ml olacak şekilde serum fizyolojik ile sulandırılarak enjeksiyon için hazırlandı) 2,27 ml/kg olacak şekilde i.p. olarak verildi. Sıvı resusitasyonu amacıyla 5 ml/kg serum fizyolojik s.k. olarak deneyin başlangıcında bir kere verildi. Ratlara cerrahi işlem olarak kolon anastomozu yapıldı. Bu grup LPS ortamında yapılan KA'da ortaya çıkan değişiklikleri göstermek için oluşturuldu.



**Kolon Anastomozu + HMB (KA + HMB) Grubu, (rat sayısı: 10):** Ratlara laparotomiden 18 saat önce LPS gruplarına verilecek LPS hacmi kadar miktarda serum fizyolojik (2,27 ml/kg) i.p. olarak verildi. Yine LPS gruplarına sıvı resusitasyonu amacıyla verilecek hacimde (5 ml/kg) serum fizyolojik s.k. olarak deneyin başlangıcında bir kere verildi. HMB (1x2 mg/kg/gün, gavaj ile) tedavisine KA'dan 12 saat sonra başlandı ve 7 gün sürdü. Bu grup HMB tedavisi ile KA'da ortaya çıkan değişiklikleri göstermek için oluşturuldu.

**LPS + Kolon Anastomozu + HMB (LPS + KA + HB) Grubu, (rat sayısı: 10):** Ratlara laparotomiden 18 saat önce 2 mg/kg LPS 2,27 ml/kg olacak şekilde i.p. olarak verildi. Sıvı resusitasyonu amacıyla 5 ml/kg serum fizyolojik s.k. olarak deneyin başlangıcında bir kere verildi. HMB (1x2 mg/kg/gün, gavaj ile) tedavisine KA'dan 12 saat sonra başlandı ve 7 gün sürdü. Bu grup LPS ortamında yapılan KA'da HMB tedavisinin ortaya çıkardığı değişiklikleri göstermek için oluşturuldu.

### **Cerrahi Model**

Ratlar yapılacak cerrahi operasyondan 12 saat önce aç bırakıldı; bu süre içinde yalnız sıvı alımına izin verildi. Cerrahi operasyondan sonra ratların beslenmesi serbest bırakıldı. İntramuskuler (i.m.) Ketamin (Ketalar(, Eczacıbaşı Warner Lambert Ilac AS, İstanbul, Turkey) (50 mg/kg) ve Ksilazin 10mg/kg ile indüksiyonun ardından ratların karın bölgesi %1 povidon–iodin ile temizlendikten sonra steril örtünmeyi takiben karına orta hat laparotomi yapıldı.

Bütün ratlarda peritoneal refleksiyonun 3 cm üzerinden kolon tam kat kesilip ikiye ayrıldı. Bu işlemin ardından kesik kolon uçları 7/0 ipek ile tek tek Gambee sütür tekniği ile uç-uca anastomoz edildi (Resim 1).

Cerrahi sonrası ratların karın katları 4/0 ipek sütürlerle devamlı olarak kapatıldı. Cerrahi işlemden hemen sonra cerrahi işlem sırasındaki sıvı kayıplarını yerine koymak amacıyla 5 ml/100gr serum fizyolojik s.k. olarak verildi. Cerrahi işlemler sırasında ratlar lamba ile ısıtıldı. Cerrahi sonrası analjezi amacıyla 2,5 mg/kg flunixin i.m. yapıldı.

Kolon anastomozundan 168 saat (7 gün) sonra 50 mg/kg Ketamin i.m. ve 10 mg/kg Ksilazin i.m. ile indüksiyonun ardından ratların toraks ve karın bölgesi %1 povidon–iodin ile temizlendikten sonra steril örtünmeyi takiben torakotomi ve laparotomi yapılarak kan ve doku örnekleri alındı. Toraks açılarak biyokimyasal

analizler için intrakardiyak ponksiyonla kan alındı; servikal dislokasyonla ratlara sakrifikasyon yapıldı.



**Resim 1.**İnen kolona kesi sonrası anastomoz

Daha sonra kolon anastomozunu içeren 5 cm'lik kolon segmenti rezeke edildi ve anastomoz patlama basıncı ölçüldü. Çıkarılan kolon segmentinin yarısı biyokimyasal analiz, diğer yarısı histopatolojik inceleme için ayrıldı.

#### **Doku ve Kan Örneklerinin Hazırlanması ve Saklanması**

Patlama basıncı ölçüldükten sonra anastomozu içeren kolon segmenti anastomoz hattına dikey olacak şekilde ikiye bölündü. Bir parça histopatolojik değerlendirme için %10'luk formaldehitte tespit edildi. Diğer parça dokuda yapılacak biyokimyasal değerlendirmeler için alüminyum folyoya sarılarak sıvı nitrojende donduruldu ve ölçüm gününe kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Deneklerden intrakardiyak kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri hemogram ve biyokimya tüplerine bölüştürüldü. Biyokimya tüpüne alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika santrafüj edilerek serumları ayrıştırıldı. Serum örnekleri ölçüm yapılincaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

#### **Değerlendirmede Kullanılan Grup Karşılaştırmaları**

LPS'in KA'da ortaya çıkardığı farkı saptamak için KA - LPS+KA karşılaştırması yapıldı. HMB'in KA'da ortaya çıkardığı farkı saptamak için KA - KA+HMB karşılaştırması yapıldı. LPS ve HMB arasındaki farkı saptamak için LPS+KA - KA+HMB karşılaştırması yapıldı. HMB'in LPS ortamında ortaya çıkardığı farkı saptamak için LPS+KA - LPS+KA+HMB karşılaştırması yapıldı.

## **Değerlendirme Parametreleri**

### **Ratların Ağırlık Değişimi**

Deneyin başlangıcında ve sakrifikasyon aşamasında olmak üzere ratların ağırlıkları hassas tartı aleti ile tartıldı ve ağırlık değişimleri belirlendi.

### **Anastomoz patlama basıncı**

Patlama Basıncının Ölçülme Tekniği: Yedinci günde yapılan laparotomi sırasında sol kolondan 5 cm'lik segment (anastomozun proksimal ve distalinden 2.5 cm) rezeke edildi. Çıkartılan segmentin distali 3/0 ipek suturele bağlandı. 8 F silikon katater proksimal uçtan geçirilip 3/0 ipek ile bağlandı (Resim 2).

Silikon kataterin diğer ucu basınç transducer'ına bağlandı. Patlama basıncı ölçümü için şırınga pompasıyla (62-HF-0267-00, Abbott, Chicago, USA) 2 ml/dk'dan serum fizyolojik infüzyonu yapıldı. Basınç disposable basınç transducer'ı ile monitorize edilip Hewlett-Packard recorder (Biopac MP-100 Acquisition System, Version 3.5.7 Santa Barbara, USA) ile kaydedildi (Resim 3). Kaçağın oluştuğunu gösteren pik basınç (mmHg); patlama basıncı olarak değerlendirildi.



**Resim 2.** Anastomoz patlama basıncı ölçüm tekniği.



**Resim 3.** Patlama basıncı ölçüm düzeneği.

### **Biyokimyasal incelemeler**

Biyokimyasal incelemeler kan ve doku örnekleri üzerinde yapıldı. Kanda lökosit ve tümör nekroz faktör- $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ], serum miyeloperoksidaz [MPO], serum nitritnitrat, serum nitrat, serum süperoksit dismutaz [SOD], serum hidroksiprolin, serum malondialdehit [MDA] bakıldı. Anastomoz dokusunda miyeloperoksidaz [MPO], malondialdehit [MDA], süperoksit dismutaz [SOD], nitrit-nitrat, nitrat, hidroksiprolin, TNF- $\alpha$ ) ve histopatolojik incelemeler (Hematoksilen-Eozin [H-E] ve immünohistokimyasal indüklenebilir nitrik oksit sentaz [iNOS]) bakıldı.

**Kanda hemogram ölçümü:** Tam kan sayımı, Sysmex XT 2000İ cihazı ile bakıldı. Lökosit sayısı 1000/ $\mu$ L olarak verildi.

**Serum ve Doku MPO ölçümü:** Serum MPO düzeyi için önceden hazırlanmış olan serum homojenat örneği MPO Rat Elisa Kit USCN Life Science Inc. (Houston, USA, Cat No: E90601Ra) ile çalışıldı. Serum MPO düzeyi pg/mL olarak hesaplandı. Doku MPO ölçümü için tüm dokular tartıldı. 300 mg dokuya 5 ml. 0.02 M EDTA (pH:7.4) hesabıyla doku miktarına göre EDTA konularak 60 saniye homojenize edildi. Homojenatın 1.5 ml'si 20.000 devirde (15 dakika +4°C'de) santrafüje edildi, süpernatant atıldı. 0.05 M KPO4 (pH:6) tamponu içinde %0.5 HETAAB (Hekza Adezil Trimetil Amonyum Bromid) hazırlandı. Pellet 1,5 ml HETAAB ile yeniden homojenize edildi. Homojenat 20.000 devirde tekrar (15 dakika +4°C'de) santrafüje edildi, süpernatant çalışma için alındı. Doku örneklerindeki MPO düzeyleri Golowich<sup>154</sup> ve ark.'nın geliştirdikleri yöntemle saptandı. Yöntem hidrojen peroksitin homojenat ve serumdaki MPO tarafından

oksitlenerek o-dianozidini redüklemesi ve redükte o-ianozidinin 410 nm'de ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Bulunan sonuçlar pg/ gr protein olarak hesaplandı.

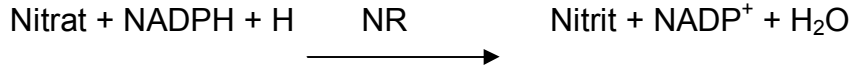
**Serum ve Doku MDA ölçümü:** Serum MDA düzeyi için önceden hazırlanmış olan serum homojenat örneği TBARS Assay Kit Cayman Chemical Company, (Michigan, USA, Cat No: 10009055) ile çalışıldı. Serum MDA düzeyi  $\mu\text{M}$  olarak hesaplandı. Doku MDA ölçümü için tüm dokular tartıldı. Doku ağırlıkları 50 mg. dokuya 500  $\mu\text{L}$  0.15 M KCl eklenerek homojenize edildi. Doku örneklerindeki MDA düzeyleri Yagi.<sup>137</sup> ve ark.'nın geliştirdikleri yöntemle göre saptandı. Aerobik şartlarda homojenatın pH:3.4'de tiyobarbitürik asit ile 95°C'de inkübasyonu sonucu eğer lipid peroksidasyonu var ise bunun sekonder bir ürünü olan malondialdehit oluşur. Oluşan MDA tiyobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu renk şiddetinin 532 nm.'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipid peroksidasyonu saptanır. Bulunan sonuçlar  $\mu\text{M}/\text{gr}$  protein olarak hesaplandı.

**Serum ve Doku SOD aktivitesi ölçümü:** Serum SOD aktivitesi ölçümü için önceden hazırlanmış olan serum homojenat örneği Superoxide Dismutase Assay Kit Cayman Chemical Company, (Michigan, USA, Cat No: 706002) ile çalışıldı. Serum SOD aktivitesi düzeyi  $\mu\text{l} / \text{mL}$  olarak hesaplandı. 100 mg doku 1ml serum fizyolojikte homojenize edilerek hazırlandı ve homojenat SOD düzeyleri Durak<sup>155</sup> ve ark.'nın geliştirdiği yöntemle göre çalışıldı. Bu yöntemle göre, Ksantin- ksantin oksidaz sistemi ile süperoksit radikali üretilir. Ortamda yüksek süperoksit radikali NBT'yi (nitroblue tetrazoluim) redükler ve mavi renk oluşur. Ortamdaki SOD miktarına göre süperoksit radikalin ortamdaki kalkması ve NBT redüksiyonunun inhibe olması mavi rengin şiddetinde azalmaya neden olur. Yöntem bu prensibe dayanmaktadır. Sonuçlar  $\mu\text{l} / \text{gr}$  protein olarak değerlendirildi.

**Serum ve Doku Nitrit-Nitrat ölçümü:** Serum Nitrit-Nitrat düzeyi için önceden hazırlanmış olan serum homojenat örneği Nitrite/Nitrate Colorimetric Assay Kit Cayman Chemical Company, (Michigan, USA, Cat No: 780001) ile çalışıldı. Serum Nitrit-Nitrat düzeyi  $\mu\text{M}/\text{mL}$  olarak hesaplandı. 100 mg doku 1ml fosfat buffer (ph: 7) ile homojenize edildi ve elde edilen homojenat çalışma için kullanıldı. Bu çalışmada nitrit ve nitrat ölçümleri nitrit-nitrat kolorimetrik assay kiti

(Nitrite / Nitrate colorimetric method, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanılarak yapıldı.

Nitrojen monoksit biyolojik sıvılarda nitrit olarak tespit edilmektedir. Örnekte mevcut olan nitrat ise NADPH varlığında nitrat redüktaz (NR) enzimiyle nitrite redüklenir.



Oluşan nitrit ise sülfanilamid ve N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorid ile reaksiyona girerek kırmızı viole diazo boyası meydana getirir. Oluşan bu rengin şiddeti ise spektrofotometrik olarak, 540 nm dalga boyunda ölçülür.

Koenzim tabletlerinin hazırlanması: Her birinde 0,5 mg NADPH ve 0,01 mg FAD içeren tabletler potasyum fosfat tamponu ile steril bir düz biyokimya tüpü içerisinde çözüldü. 1 adet tablet için 3 ml tampon kullanılacak şekilde bu miktar örnek sayısına göre ayarlandı. Bu işlem çalışmadan hemen önce yapıldı.

Nitrat redüktaz hazırlanması: 4 ünite liyofilize enzim içeren bir şişe 0,7 ml redistile su ile çözüldü. Enzim çözünmüş şekli ile +4°C'de 2 hafta dayanabilmektedir.

Sülfanilamid ve N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorid boyları ile potasyum fosfat tamponu kit içinde hazır olarak bulunmakta idi.

Yöntem:

Nitrit ölçümü için tüm örnekler ve standartlar aynı yöntemle çalışıldı. Tüplere 500 µl serum örneği ve üzerine 270 µl distile su eklendi. Ayrıca çalışma körü hazırlamak için örnek yerine aynı miktarda distile su konuldu. Tüpler iyice karıştırıldı, oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra enzim linked immunoassay (ELISA) okuyucusunda (Organon Teknika microwell system reader 230 S) 540 nm dalga boyunda çalışma körüne karşı örneklerin absorbansları okundu. Bu işlem ile örnek körünün absorbans değerleri tespit edilmiş oldu (A1). Daha sonra kör ve örnek tüplerine önce 250 µl sülfanilamid içeren boya reaktifi, ardından 250 µl N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorid içeren boya reaktifi eklendi. Tüm tüpler yine oda ısısında ve karanlıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Aynı dalga boyunda tekrar ölçüm yapıldı (A2). İkinci absorbans değerinden (A2) birinci değer (A1) çıkarılarak örnekte başlangıçta bulunan nitrit absorbansı tespit edilmiş oldu.

**Nitrit-nitrat ölçümü:** Çalışmanın bu kısmının amacı örneklerin içerisinde mevcut olan nitratların nitrit haline çevrilmesidir. Tüm tüplere 500 µl serum pipetlendi ve üzerine 250 µl daha önce hazırlanan koenzim ve 20 µl yine daha önce hazırlanan enzim solüsyonları eklendi. Ayrıca çalışma körü hazırlamak için örnek yerine aynı miktarda distile su konularak üzerine koenzim ve enzim solüsyonları eklendi. Tüpler iyice karıştırıldı, oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra ELISA okuyucusunda 540 nm dalga boyunda çalışma körüne karşı örneklerin absorbansları okundu. Bu işlem ile örnek körünün absorbans değerleri tespit edilmiş oldu (A1). Daha sonra kör ve örnek tüplerine önce 250 µl sülfanilamid içeren boya reaktifi, ardından 250 µl N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorid içeren boya reaktifi eklendi. Tüm tüpler yine oda ısısında ve karanlıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Aynı dalga boyunda tekrar ölçüm yapıldı (A2). İkinci absorbans değerinden (A2) birinci değer (A1) çıkarılarak, başlangıçta örnek içinde varolan ve inkübasyon sırasında nitratlardan redüklenen total nitrit absorbansları tespit edilmiş oldu.

Total nitrit absorbans değerlerinden nitrit absorbansları çıkartılarak örneklerdeki nitrat absorbans değerleri elde edilmiş oldu. Absorbansların tespitinin ardından nitrit ve nitrat için ayrı ayrı hazırlanmış olan standart eğriler yardımıyla örnek konsantrasyonları hesaplandı. Nitrit ve nitrat konsantrasyonları toplanarak sonuçlar total nitrit+nitrat konsantrasyonu olarak µM/gr protein cinsinden verildi.

**Serum ve Doku TNF-α ölçümü:** Doku TNF-α düzeyi için 100mg doku 500 uL doku lizis buffer ile homojenize edildi ve elde edilen doku homojenatında 100ul alınarak TNF-α düzeyleri çalışıldı. Doku TNF-α düzeyi pg/ gr protein olarak hesaplandı.

Serum ve doku homojenat TNF-α düzeyi ölçümü solid faz ELISA prensibine dayanan Raybitech firmasının Rat TNF-α (Norcross, USA) hazır ölçüm kiti kullanılarak yapıldı. TNF-α ve düzeylerinin ölçümü amacıyla -20°C 'de muhafaza edilen deney ve kontrol grubunun serumları oda ısısında çözdürüldükten sonra hazır ölçüm kiti kullanılarak yapıldı.

Bunun için ELISA pleytinin standart kuyucuklarına 100 µl standart dilüsyonu ve blank kuyucuğuna 100 µl sadece standart dilüsyonundan, numune kuyucuklarına ise 100 µl serum, konuldu. 2,5 saat oda ısısında bekletildi. Daha sonra dört kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve her bir kuyucuğa 100 µl

biotinylated anti-TNF- $\alpha$  konjugat solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında Reaksiyonun oluşması için 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Sürenin sonunda her bir kuyucuk 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı, iyice aspire edildi. Daha sonra 100  $\mu$ l Streptavidin-HRP çalışma solüsyonundan her bir kuyucuğa eklenip 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 100  $\mu$ l stabilize kromojen TMB substrat reagent eklendi ve rengin maviye döndüğü gözlemlendiğinde 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi. Sürenin sonunda 100  $\mu$ l stop solüsyonundan her bir kuyucuğa eklendi hafif çalkalayarak rengin sarıya döndüğü gözlemlendi ve TNF- $\alpha$  düzeyleri ELİSA cihazında 450nm 'de okundu ve ölçümler ng/ml olarak verildi.

**Serum ve Doku hidroksiprolin ölçümü:** Serum hidroksprolin düzeyi için önceden hazırlanmış olan serum homojenat örneği Hydroxyproline(Hyp) ELISA Kit (Cusabio Biotech Co., LTD, China Rat Cat No: CSB-E08838r) ile çalışıldı. Serum hidroksiprolin değerleri ng/mL olarak hesaplandı. Doku hidroksiprolin düzeyleri Far Diagnostik (Italy) ticari kit ile belirlendi. Bu kitin çalışma protokolüne göre çalışıldı. Tartılan doku örnekleri vidalı teflon kapaklı hidroliz tüplere konduktan sonra hidroklorik asit eklenerek 102 °C 'de 16 saat hidrolize edildi. Hidrolizat soğutulduktan sonra sodyum hidroksit ile nötralize edildi. Nötralize örnek filtre edildi. Bu filtrat kit protokolüne belirli kimyasallar eklenerek elde edilen renk spektrofotometrede 560 nm de optik dansitede okundu. Bulunan mg/L hidroksiprolin düzeylerinden ng/ gr protein olarak hesaplandı.

### **Histopatolojik değerlendirme**

Anastomoz bölgesine ait kolon doku örnekleri bekletilmeden % 10'luk formaldehit solüsyonuna konuldu ve bu solüsyonda 24 saat süre tespit edildi. Tespit aşamasından sonra üzerine numara yazılmış olan kasetlere yerleştirildi. Değişen derecelerdeki alkol ve ksilollerden geçirilen dokular 56 °C 'ye kadar ısıtılmış parafinde bekletildi. Parafine gömülmüş dokulardan hazırlanan bloklardan mikrotom yardımıyla 5 $\mu$  kalınlığında kesitler elde edilerek lamaların üzerine alındı. Hazırlanan lamalar deparafinize edilip Hematoksilen-eozin (H-E) boyası ile boyanarak preparatlar hazırlandı. Preparatlar Olympus BX50 ışık mikroskopunda hangi gruplara ait örnekler olduğunu bilmeyen patolog tarafından değerlendirildi.



Barsak anastomoz iyileşmesini evrelemek için de Sousa'nın kullanmış olduğu skorlama sistemi kullanıldı<sup>182</sup>. Bu sisteme göre skorlama 0-3 arasında yapılmıştır. Bu skorlamaya göre boyanma şiddetinin ve yaygınlığının değerlendirilmesi:

0-Boyanma yok

1-Hafif şiddette boyanma

2-Orta şiddette boyanma

3-Şiddetli boyanma

**İmmünohistokimyasal (İNOS) değerlendirme:** Anastomoz bölgesine ait kolon doku örnekleri bekletilmeden % 10'luk formaldehit solüsyonuna konuldu ve bu solüsyonda 24 saat süre tespit edildi. Tespit aşamasından sonra üzerine numara yazılmış olan kasetlere yerleştirildi. Kesitler 58 °C'de bir gece bekletildi. Daha sonra hidrojen peroksitte 5-7 dakika bekletilip ve distile suyla yıkandı. Ardından Sitrat-Tampon içinde 5x2=10 dakika mikrodalga fırında kaynatıldı. Mikrodalga fırından çıkarılıp 30 dakika soğumaya bırakıldı. Distile suda iki kez yıkayıp, Fosfat tampon çözeltisinde (Phosphat Buffered Solue [PBS]) beş dakika bekletildi. UV blok damlatılıp, 10 dakika bekletildi. Sonra primer antikor (İNOS) damaltılıp 1 saat bekletildi. Tekrar PBS ile yıkayıp, arkasından sarı solüsyon damlatılıp 15 dakika bekletildi ve tekrar PBS ile yıkandı. Pembe solüsyon damaltılıp 5 dakika bekletildi. PBS ile yıkandı. Ardından AEC kromojen (1000 mikrona bir damla) damlatılıp 5-10 dakika bekletildi. Tekrar PBS ile yıkandı. Daha sonra distile su ile yıkandı. Sonra çeşme suyu ile yıkandı. Kurut ve immün kapama maddesiyle kapatıldı. Hazırlanan lamlar deparafinize edilip İNOS boyası ile boyanarak preparatlar hazırlandı. Preparatlar Olympus BX50 ışık mikroskopunda örneklerin hangi gruplara ait olduğunu bilmeyen patolog tarafından değerlendirildi. Hazırlanan preparatların değerlendirilmesinde de Sousa'nın kullanmış olduğu skorlama sistemi kullanıldı<sup>182</sup>. Bu sisteme göre skorlama 0-3 arasında yapılmıştır. Bu skorlamaya göre boyanma şiddetinin ve yaygınlığının değerlendirilmesi:

0-Boyanma yok

1-Hafif şiddette boyanma

2-Orta şiddette boyanma

3-Şiddetli boyanma

## **İstatistiksel Analiz**

Sürekli değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma cinsinden, kategorik değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler frekans ve yüzde cinsinden özetlenmiştir. Biyokimyasal ölçümler bakımından grupların karşılaştırılmasında One-Way ANOVA ve Tukey HSD post hoc testlerinden yararlanılmıştır.

Ağırlık ölçümlerinin analizinde Repeated Measurement ANOVA testi kullanılmış, gruplar arasındaki farklılığın saptanması amacıyla ise Bonferroni post hoc testinden yararlanılmıştır.

Patolojik değerlendirmeler bakımından grupların karşılaştırılması amacıyla Fisher-Freeman-Halton test kullanılmış ve Monte Carlo simülasyonu ile exact p değerleri elde edilmiştir.

İstatistik analizlerde  $p < 0,05$  ise sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir. İstatistik analizler PASW Statistics (SPSS) v.18 paket programı ile yapılmıştır.

## BULGULAR

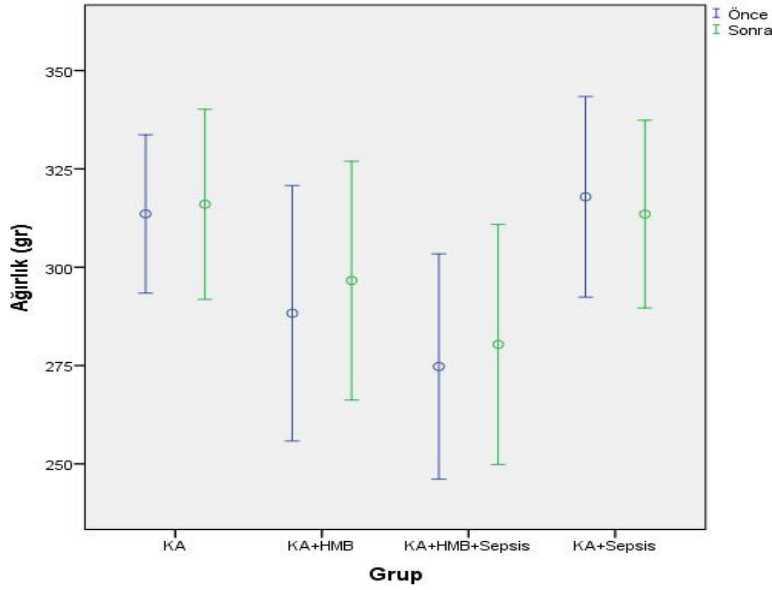
### Ratların Ağırlık Değişimi

Rat ağırlıkları operasyon öncesinde ölçüldüğünde; KA için ortalama değeri 313,56 ±26,17 gr, KA+LPS için ortalama değeri 317,90 ± 35,65 gr, KA+HMB için ortalama değeri 288,30± 45,40 gr, KA+LPS+HMB için ortalama değeri 274,75 ± 34,25 gr olarak saptandı. (Tablo 1) Gruplar arasında deney başlangıcında ağırlıklar açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (p:0,052) (Şekil 4)

Rat ağırlıkları sakrifikasyon aşamasında ölçüldüğünde; KA için ortalama değeri 316,00 ±31,46gr, KA+LPS için ortalama değeri 313,50 ± 33,36 gr, KA+HMB için ortalama değeri 296,60 ± 42,44 gr, KA+LPS+HMB için ortalama değeri 280,38 ± 36,50 gr olarak saptandı. Sepsis grubunda önce ölçülen ağırlık değeri sonra ölçülen ağırlık değerine göre düşüş göstermiştir. KA+LPS+HMB, KA+HMB ve KA gruplarında bir miktar ağırlık artışı olmuştur. Ancak gruplar arasındaki önce sonra ağırlıkları bakımından etkileşim anlamlı değildir. (p:0,062) Ağırlık değişimleri yönünden gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. (p:0,166)

**Tablo 1.** Ratlara ait ağırlık değerleri (gr)

Günler	Gruplar			
	KA	LPS +KA	KA + HMB	LPS + HMB + KA
Başlangıç (0. gün)	313,56 ± 26,17	317,90 ± 35,65	288,30 ± 45,40	274,75 ± 34,25
8. Gün	316,00 ± 31,46	313,50 ± 33,36	296,60 ± 42,44	280,38 ± 36,50



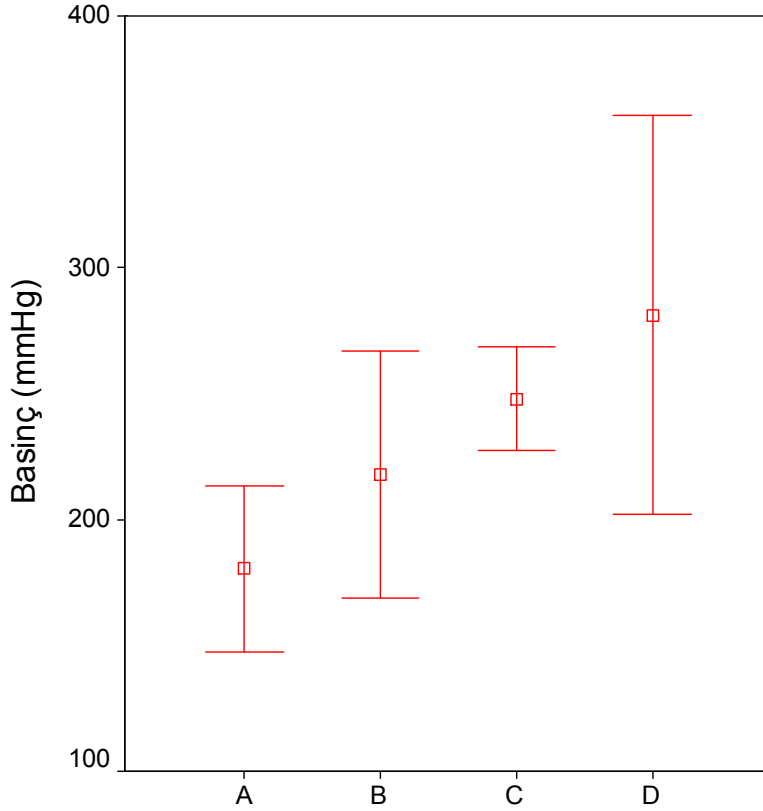
**Şekil 4.** Ratların deney sürecindeki ağırlık değişimleri.

#### **Anastomoz patlama basıncı**

Anastomoz patlama basınçları ortalama değerleri; KA grubu için 247,89  $\pm$ 26,96 mmHg, KA+LPS grubu için 180,44  $\pm$ 46,11 mmHg, KA+HMB grubu için 281,26  $\pm$ 103,01 mmHg, KA+LPS+HMB grubu için 217,86  $\pm$ 58,73 mmHg olarak saptandı.

Hmb uygulanan gruplar ile diğer gruplar ile karşılaştırıldığında artış saptanmıştır. Ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı fark göstermediği tespit edildi.

KA+LPS+HMB grubunda basınç KA+LPS grubuna göre daha yüksek saptandı. Ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı görülmedi. (p:0,619) Yine KA+LPS+HMB grubundaki basınç KA gruba göre daha yüksek ancak istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi. (p:0,696) Gruplar arasındaki istatistiksel olarak tek anlamlı fark KA+LPS grubu ile KA+HMB grubu arasında (p:0,011) görülmüştür. (Şekil 5)



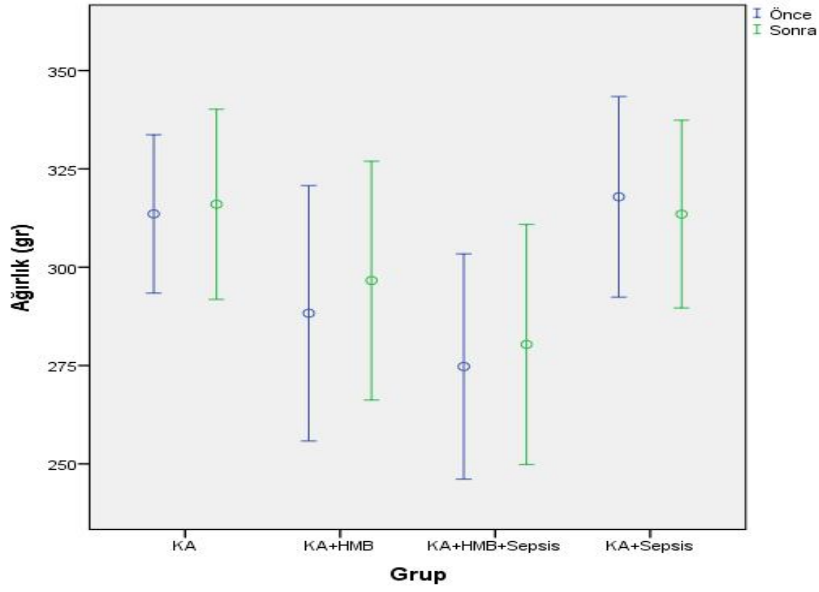
**Şekil 5.** Kolon anastomoz patlama basıncı ile ilgili grafik. (A:KA+LPS, B:KA+LPS+HMB, C:KA, D:KA+HMB)

### **Biyokimyasal incelemeler**

#### **Hemogram (Lökosit sayısı):**

Lökosit sayıları incelendiğinde ortalama değerleri; KA grubu için  $4477,78 \pm 2682,08/\mu\text{L}$ , KA+LPS grubu için  $6992,00 \pm 3847,55/\mu\text{L}$ , KA+HMB grubu için  $2630,00 \pm 2459,92/\mu\text{L}$ , KA+LPS+HMB grubu için  $5452,50 \pm 2707,36/\mu\text{L}$  olarak saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. (p:0,022)

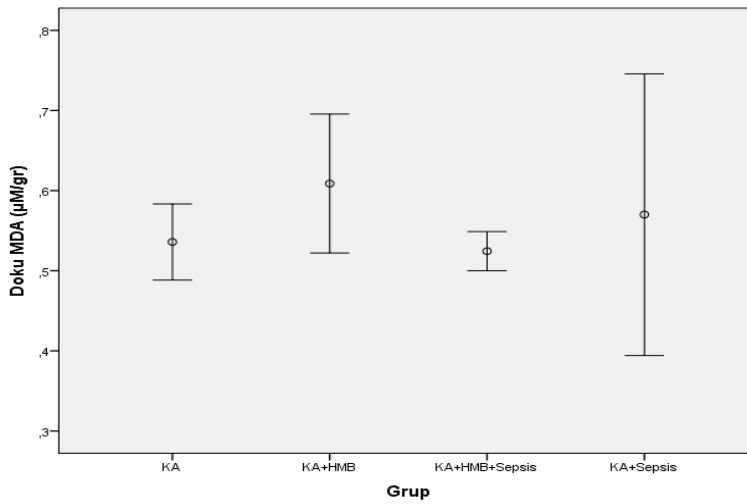
Lökosit bakımından gözlenen bu farklılık sadece KA+HMB ile KA+LPS grubu arasında ortaya çıkmaktadır. KA+HMB grubu KA+LPS+HMB grubuna göre istatistiksel fark önemli şekilde düşüken, diğer tüm gruplar birbirilerine benzerlik göstermektedir. (Şekil 6)



**Şekil 6.** Lökosit sayımı ile ilgili grafik.

### Doku MDA

Doku MDA düzeyleri ortalama değerleri; KA grubu için  $0,54 \pm 0,06$   $\mu\text{M}/\text{gr}$  protein, KA+LPS grubu için  $0,57 \pm 0,25$   $\mu\text{M}/\text{gr}$  protein, KA+HMB grubu için  $0,61 \pm 0,12$   $\mu\text{M}/\text{gr}$  protein, KA+LPS+HMB grubu için  $0,52 \pm 0,03$   $\mu\text{M}/\text{gr}$  protein olarak saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. (p: 0,608) (Şekil 7)

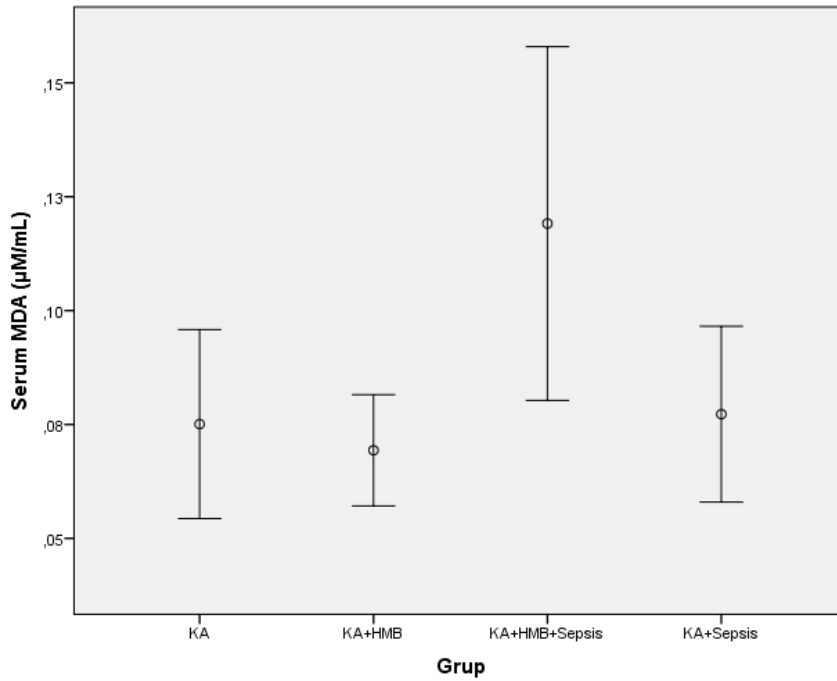


**Şekil 7.** Doku MDA ile ilgili grafik.

### Serum MDA

Serum MDA düzeyleri ortalama değerleri; KA grubu için  $0,08 \pm 0,03 \mu\text{M}$ , KA+LPS grubu için  $0,08 \pm 0,03 \mu\text{M}$ , KA+HMB grubu için  $0,07 \pm 0,02 \mu\text{M}$  KA+LPS+HMB grubu için  $0,12 \pm 0,05 \mu\text{M}$  olarak saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. (p: 0,007)

İstatistiksel olarak gözlenen bu farklılık KA+LPS+HMB grubundan kaynaklanmaktadır. KA+LPS+HMB grubu diğer tüm gruplardan istatistik önemli şekilde yüksekken, diğer gruplar birbirilerine benzerlik göstermektedir. (Şekil 8)

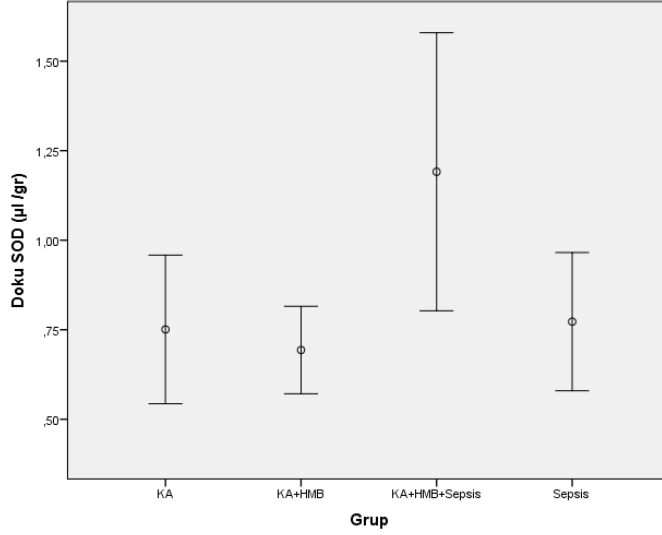


Şekil 8. Serum MDA ile ilgili grafik.

### Doku SOD aktivitesi

Doku SOD düzeyleri ortalama değerleri; KA grubu için  $0,75 \pm 0,27 \mu\text{l /gr}$  protein, KA+LPS grubu için  $0,77 \pm 0,27 \mu\text{l /gr}$  protein, KA+HMB grubu için  $0,69 \pm 0,17 \mu\text{l /gr}$  protein, KA+LPS+HMB grubu için  $1,19 \pm 0,46 \mu\text{l /gr}$  protein olarak saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. (p: 0,007)

Gözlenen bu farklılığın KA+LPS+HMB grubundan kaynaklanmaktadır. KA+LPS+HMB grubu diğer tüm gruplardan istatistik önemli şekilde yüksekken, diğer gruplar birbirilerine benzerlik göstermektedir. (Şekil 9)



**Şekil 9.** Doku SOD aktivitesi ile ilgili grafik.

### **Serum SOD aktivitesi**

Serum SOD düzeyleri ortalama değerleri; KA grubu için  $3,75 \pm 1,35$  µl /mL, KA+LPS grubu için  $3,86 \pm 1,35$  µl /mL, KA+HMB grubu için  $3,46 \pm 0,86$  µl /mL, KA+LPS+HMB grubu için  $5,96 \pm 2,32$  µl /mL olarak saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. (p: 0,007)

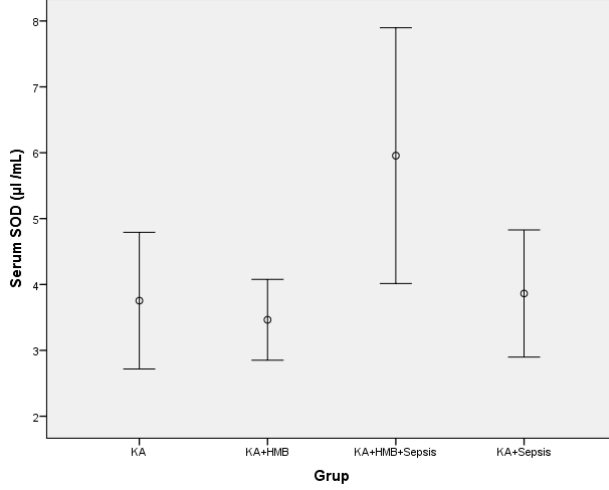
Gözlenen bu farklılığın KA+LPS+HMB grubundan kaynaklanmaktadır. KA+LPS+HMB grubu diğer tüm gruplardan istatistik önemli şekilde yüksekken, diğer gruplar birbirilerine benzerlik göstermektedir. (Şekil 10)

### **Doku Nitrit-Nitrat**

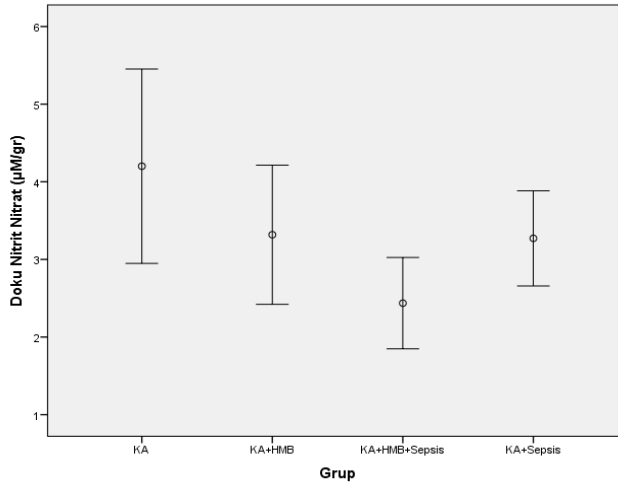
Doku nitrat-nitrit düzeyleri ortalama değerleri; KA grubu için  $4,20 \pm 1,63$  µM/gr protein, KA+LPS grubu için  $3,27 \pm 1,25$  µM/gr protein, KA+HMB grubu için ortalama ve  $3,32 \pm 0,86$  µM/gr protein, KA+LPS+HMB grubu için  $2,44 \pm 0,70$  µM/gr protein olarak saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. (p: 0,036) Doku nitrat-nitrit bakımından gözlenen bu farklılık sadece KA+LPS+HMB ile KA grubu arasında ortaya çıkmaktadır. KA+LPS+HMB



grubundaki Doku nitrat-nitrit değerleri KA grubuna göre istatistiksel olarak önemli Şekilde düşükken, diğer gruplar birbirilerine benzerlik göstermektedir. (Şekil 11)



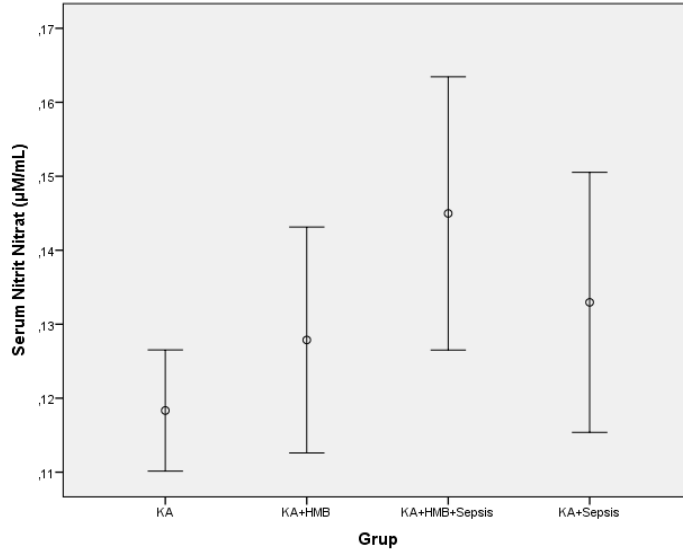
**Şekil 10.** Serum SOD aktivitesi ile ilgili grafik.



**Şekil 11.** Doku Nitrit-Nitrat düzeyleri ile ilgili grafik.

### Serum Nitrit-Nitrat

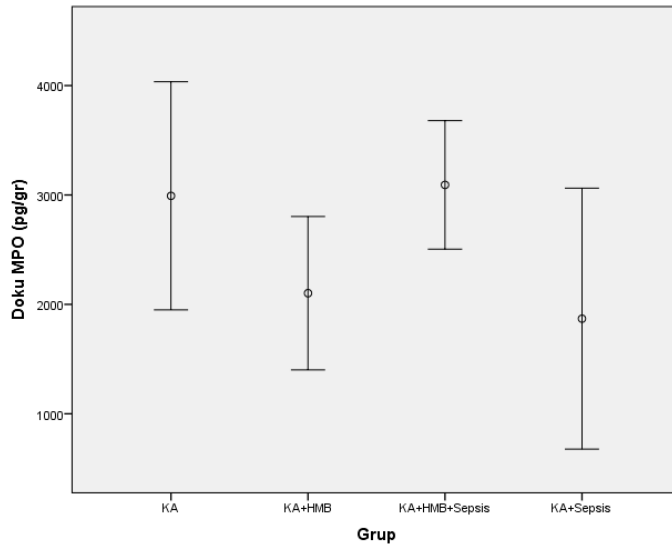
Serum nitrat-nitrit düzeyleri ortalama değerleri; KA grubu için  $0,12 \pm 0,01 \mu\text{M}/\text{mL}$ , KA+LPS grubu için  $0,13 \pm 0,02 \mu\text{M}/\text{mL}$ , KA+HMB grubu için  $0,13 \pm 0,02 \mu\text{M}/\text{mL}$ , KA+LPS+HMB grubu için  $0,14 \pm 0,02 \mu\text{M}/\text{mL}$  olarak saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. ( $p: 0,077$ ) (Şekil 12)



**Şekil 12.** Serum Nitrit-Nitrat düzeyleri ile ilgili grafik.

### Doku MPO

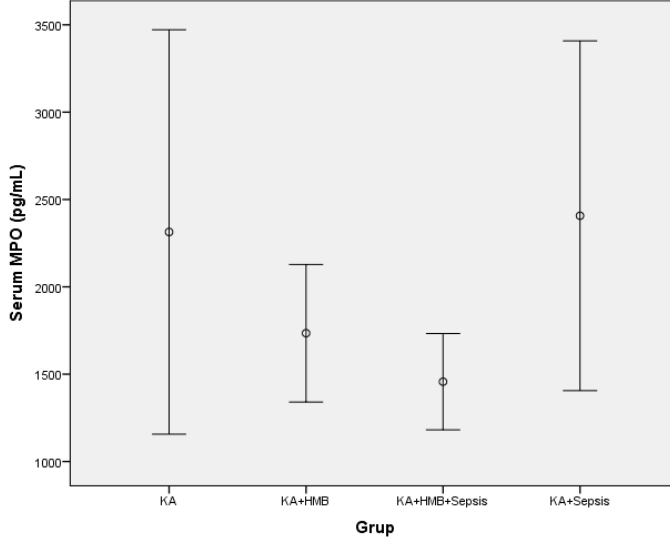
Doku MPO düzeyleri ortalama değerleri; KA grubu için  $2992,25 \pm 1356,22$  pg/ gr protein, KA+LPS grubu için  $1869,20 \pm 1667,10$  pg/ gr protein, KA+HMB grubu için  $2102,03 \pm 980,63$  pg/ gr protein, KA+LPS+HMB grubu için  $3092,28 \pm 703,22$  pg/ gr protein olarak saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. (p: 0,103) (Şekil 13)



**Şekil 13.** Doku MPO düzeyleri ile ilgili grafik.

## Serum MPO

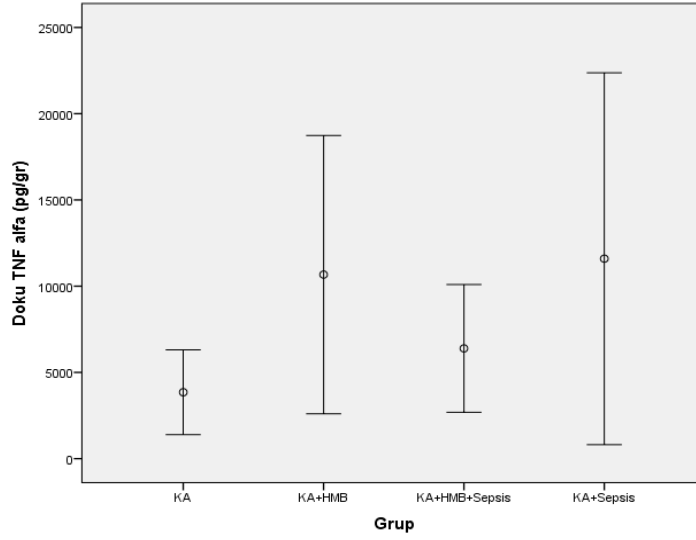
Serum MPO düzeyleri ortalama değerleri; KA grubu için 2314,29 ±1505,93 pg/mL, KA+LPS grubu için 2406,93 ±1399,65 pg/mL, KA+HMB grubu için 1734,42 ±550,24 pg/mL, KA+LPS+HMB grubu için 1456,78 ±329,82 pg/mL olarak saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. (p: 0,215) (Şekil 14)



Şekil 14. Serum MPO düzeyleri ile ilgili grafik.

## Doku TNF-α

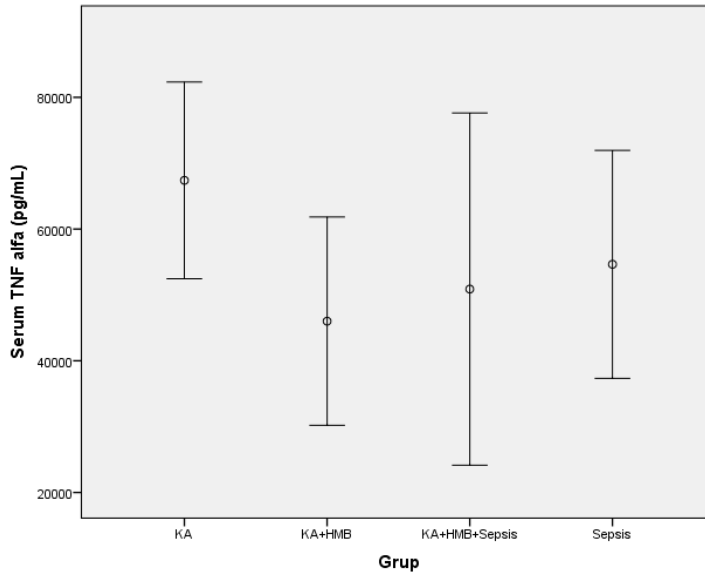
Doku TNF-α düzeyleri ortalama değerleri; KA grubu için 3848,83 ±3197,35 pg/ gr protein, KA+LPS grubu için 11593,43 ±1667,10 pg/ gr protein, KA+HMB grubu için 10670,62 ±11277,60 pg/ gr protein, KA+LPS+HMB grubu için 6391,13 ±4428,04 pg/ gr protein olarak saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. (p: 0,325) (Şekil 15)



**Şekil 15.** Doku TNF- $\alpha$  ile ilgili grafik.

### Serum TNF- $\alpha$

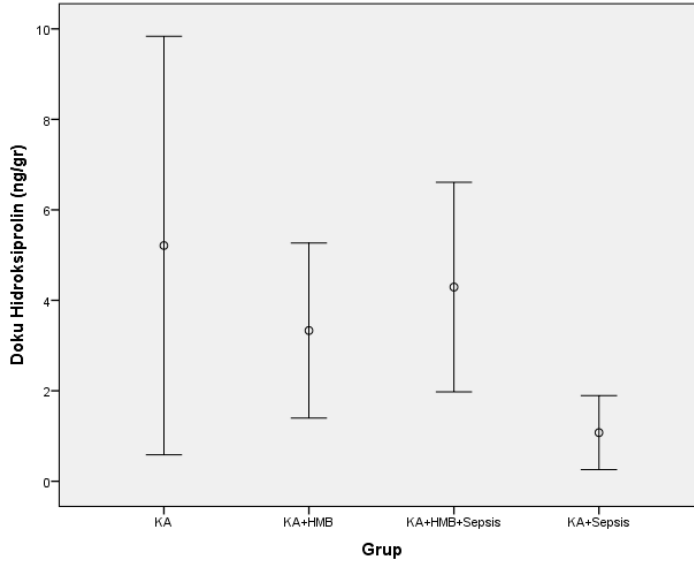
Serum TNF- $\alpha$  düzeyleri ortalama değerleri; KA grubu için 67394,22  $\pm$ 19421,40 ng/mL, KA+LPS grubu için 54644,00  $\pm$ 24190,39 ng/mL, KA+HMB grubu için 46010,00  $\pm$ 22113,16 ng/mL, KA+LPS+HMB grubu için 50883,00  $\pm$ 31991,03 ng/mL olarak saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. (p: 0,295) (Şekil 16)



**Şekil 16.** Serum TNF- $\alpha$  düzeyleri.

## Doku Hidroksiprolin

Doku Hidroksiprolin düzeyleri ortalama değerleri; KA grubu için  $5,21 \pm 6,02$  ng/ gr protein, KA+LPS grubu için  $1,08 \pm 1,14$  ng/ gr protein, KA+HMB grubu için  $3,33 \pm 2,70$  ng/ gr protein, KA+LPS+HMB grubu için  $4,29 \pm 2,77$  ng/ gr protein olarak saptandı. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. (p: 0,215) (Şekil 17)



Şekil 17. Doku Hidroksiprolin düzeyleri ile ilgili grafik.

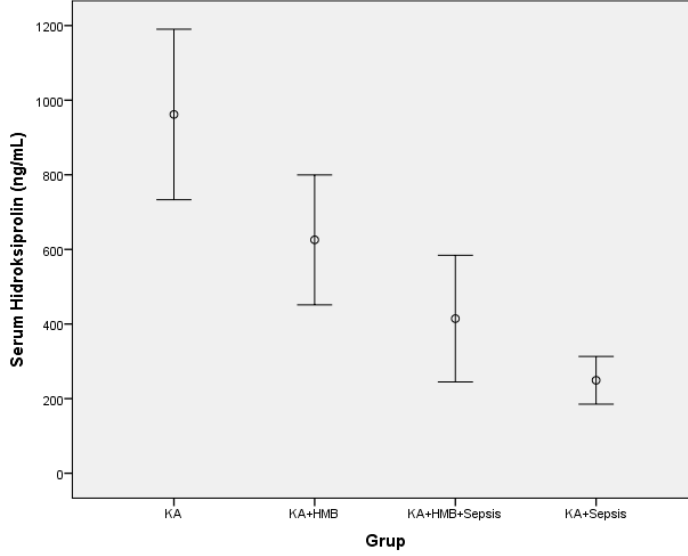
## Serum Hidroksiprolin

Serum Hidroksiprolin düzeyleri ortalama değerleri; KA grubu için  $961,78 \pm 297,14$  ng/mL, KA+LPS grubu için  $249,20 \pm 89,24$  ng/mL, KA+HMB grubu için  $625,60 \pm 243,46$  ng/mL, KA+LPS+HMB grubu için  $414,50 \pm 202,93$  ng/mL olarak saptandı.

Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. (p: 0,001) (Şekil 18)

Serum Hidroksiprolin değerleri bakımından gözlenen bu farklılık KA grubundan kaynaklanmaktadır. KA grubu diğer tüm gruplardan istatistik önemli şekilde yüksektir. Ayrıca KA+HMB ile KA+LPS grupları arasındaki fark da

istatistiksel olarak önemlidir. Sadece KA+HMB ile KA+LPS+HMB ve KA+LPS+HMB ile KA+LPS grupları birbirilerine benzerlik göstermektedir.



**Şekil 18.** Serum Hidroksiprolin düzeyleri ile ilgili grafik.

### Histopatolojik değerlendirme

#### Hematoksilen-eozin (H-E) boyası

Tüm gruplar inflamasyonun değerlendirilmesi için H-E boyası ile boyandı ve değerlendirildi.

KA yapılan grupta H-E boyanma skorlaması açısından hiç boyanmayan preperat yoktu. Bir şiddetinde boyanan preperat sayısı 1 (%11,1), iki şiddetinde boyanan preperat sayısı 7 (%77,8) ve üç şiddetinde boyanan preperat sayısı 1 (%11,1) olarak saptandı.

KA+HMB grubunda H-E ile boyanmayan preperat sayısı 3 (%30), bir şiddetinde boyanan preperat sayısı 4 (%40), iki şiddetinde boyanan preperat sayısı 2 (%20) ve üç şiddetinde boyanan preperat sayısı 1 (%10) olarak saptandı.

KA+LPS+HMB grubunda H-E ile boyanamayan 3 (%37,5) olarak görüldü. Bir şiddetinde boyanan preperat saptanmadı. İki şiddetinde boyanan preperat 3 (%37,5) ve üç şiddetinde boyanan preperat 2 (%25) olarak saptandı.

KA+LPS grubunda H-E ile boyanmayan preperat sayısı 2 (%20), bir şiddetinde boyanan preperat sayısı 1 (%10), iki şiddetinde boyanan preperat sayısı 4 (%40) ve üç şiddetinde boyanan preperat sayısı 3 (%30) olarak saptandı.

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. (p:0,148)(Tablo 2)

**Tablo 2.** H-E ile inflamasyonun değerlendirilmesi

H-E İnflamasyon Boyanma Şiddeti		Gruplar				Toplam
		KA	KA+HMB	KA+LPS+HMB	KA+LPS	
0	Sayı	0	3	3	2	8
	%	0,0%	30,0%	37,5%	20,0%	21,6%
1	Sayı	1	4	0	1	6
	%	11,1%	40,0%	0,0%	10,0%	16,2%
2	Sayı	7	2	3	4	16
	%	77,8%	20,0%	37,5%	40,0%	43,2%
3	Sayı	1	1	2	3	7
	%	11,1%	10,0%	25,0%	30,0%	18,9%
Toplam	Sayı	9	10	8	10	37
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tüm gruplar H-E ile boyanıp fibrosiz için değerlendirildiğinde:

KA grubundaki H-E ile boyanma olmayan preparatların sayısı 1 (%11,1), bir şiddetinde boyanan preparat sayısı 5 (56,5%), iki şiddetinde boyanan preparat sayısı 2 (22,2%) ve üç şiddetinde boyanan preparat sayısı 1 (11,1%) olarak saptandı.

KA+HMB grubundaki H-E ile boyanmayan preparat sayısı 4 (40%), bir şiddetinde boyanan preparat sayısı 2 (20%), iki şiddetinde boyanan preparat sayısı 4 (40%) ve üç şiddetinde boyanan preparat sayısı 0 (0%) olarak saptandı.

KA+HMB+LPS grubundaki H-E ile boyanmayan preparat sayısı 3 (37,5%), bir şiddetinde boyanan preparat sayısı 1 (12,5%), iki şiddetinde boyanan preparat sayısı 4 (50%) ve üç şiddetinde boyanan preparat sayısı 0 (0%) olarak saptandı.

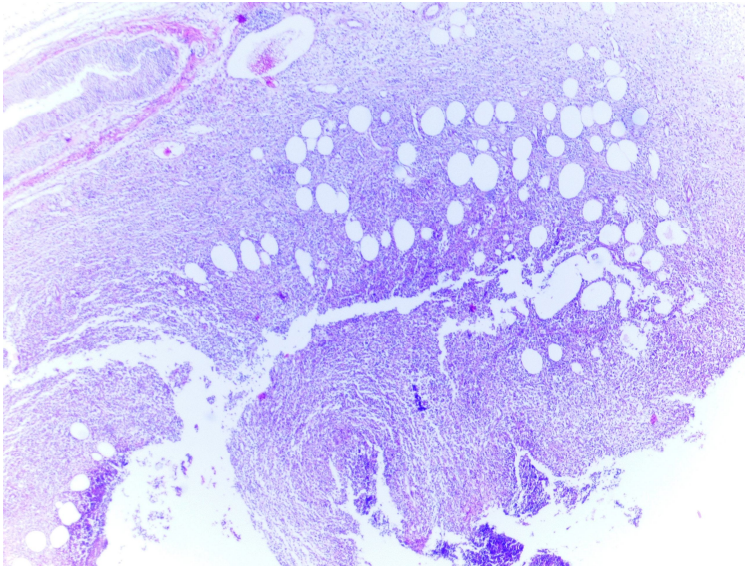
KA+LPS grubundaki H-E ile boyanma olmayan preparatların sayısı 2 (20%), bir şiddetinde boyanan preparat sayısı 1 (10%), iki şiddetinde boyanan preparat sayısı 7 (70%) ve üç şiddetinde boyanan preparat sayısı 0 (0%) olarak saptandı.

H-E ile fibrozisin değerlendirildiği gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. (p:0,224)(Tablo 3).

**Tablo 3.** H-E ile fibrozisin değerlendirilmesi

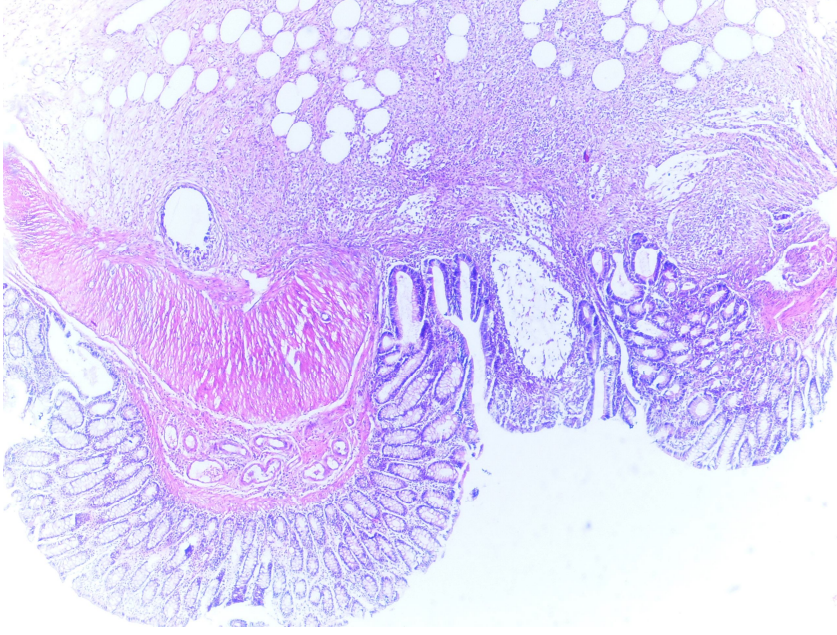
H-E inflamasyon Boyanma Şiddeti	Gruplar				Toplam	
	KA	KA+HMB	KA+LPS+HMB	KA+LPS		
0	Sayı	0	3	3	2	8
	%	0,0%	30,0%	37,5%	20,0%	21,6%
1	Sayı	1	4	0	1	6
	%	11,1%	40,0%	0,0%	10,0%	16,2%
2	Sayı	7	2	3	4	16
	%	77,8%	20,0%	37,5%	40,0%	43,2%
3	Sayı	1	1	2	3	7
	%	11,1%	10,0%	25,0%	30,0%	18,9%
Toplam	Sayı	9	10	8	10	37
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Resim 4, 5, 6 ve 7 de H-E ile boyanmış olan KA grubu, KA+LPS grubu, KA+LPS+HMB grubu ve KA+HMB gruplarındaki inflamasyon ve fibrozis gösterilmiştir.

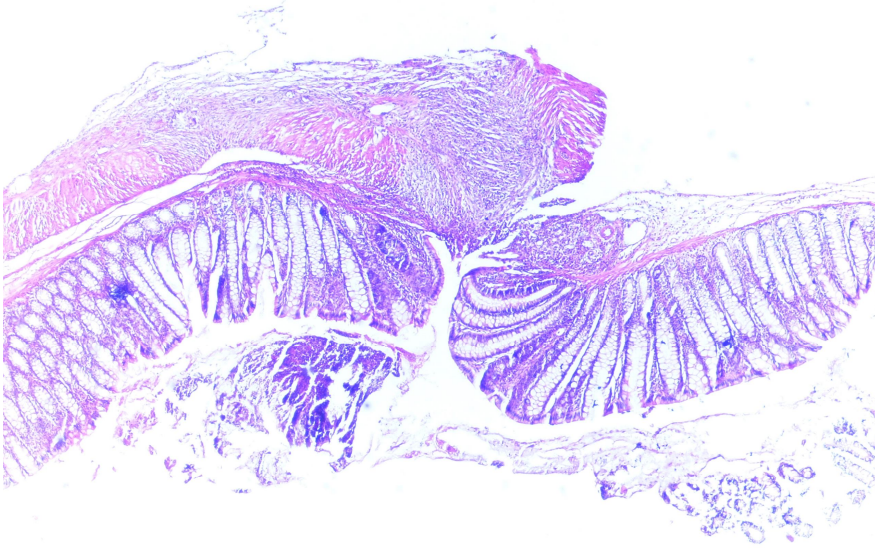


**Resim 4.** KA grubu Kolon epitelini altında şiddetli inflamasyon ve hafif şiddette fibrozis (HE, 40X)

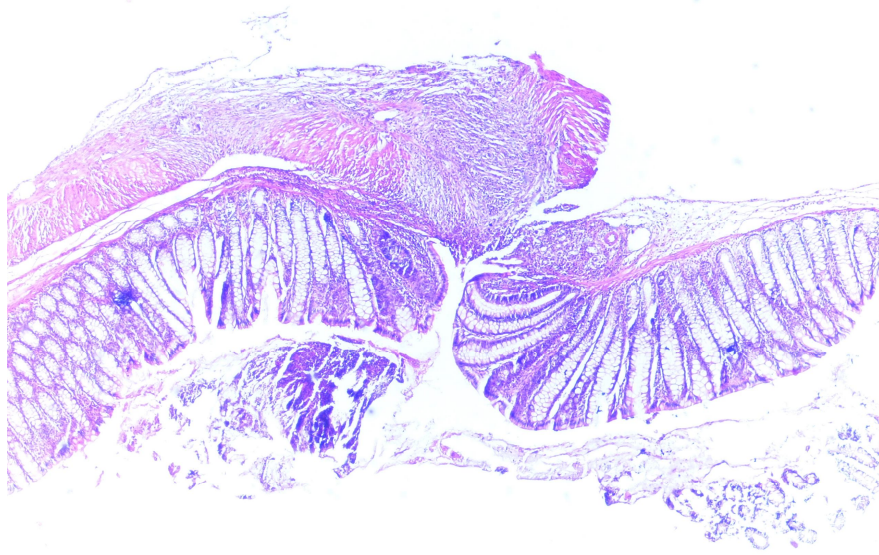




**Resim 5.** KA+LPS grubu Kolon epiteli altında orta şiddette kronik inflamasyon ve fibrozis(HE, 40X)



**Resim 6.** KA+HMB grubu: Kolon epiteli altında hafif şiddette kronik inflamasyon ve orta şiddette fibrozis (HE, 40X)



**Resim 7.** KA+HMB grubu: Kolon epitelini altında hafif şiddette kronik inflamasyon ve orta şiddette fibrozis (HE, 40X)

### **İmmünohistokimyasal (İNOS) boyanma**

İNOS' un epiteldeki dağılımının incelendiği preparatlar incelendiğinde; KA grubundaki İNOS ile boyanma olmayan preparatların sayısı 0 (0%), bir şiddetinde boyanan preparat sayısı 3 (33,3%), iki şiddetinde boyanan preparat sayısı 3 (33,3%), üç şiddetinde boyanan preparat sayısı 3 (33,3%) olarak saptandı.

KA+HMB grubundaki İNOS ile boyanma olmayan preparatların sayısı 3 (30%), bir şiddetinde boyanan preparat sayısı 4 (40%), iki şiddetinde boyanan preparat sayısı 2 (20%), üç şiddetinde boyanan preparat sayısı 1 (10%) olarak saptandı.

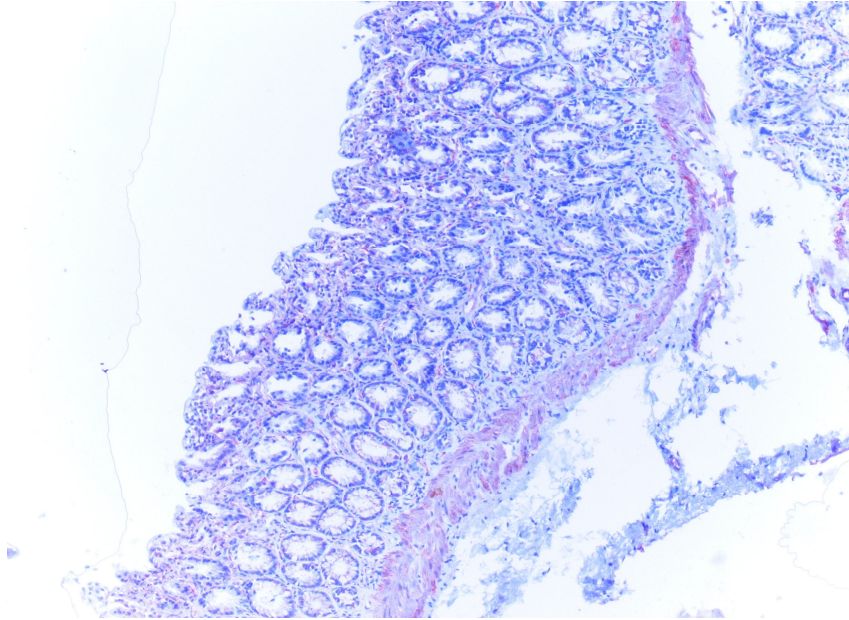
KA+HMB+LPS grubundaki İNOS ile boyanma olmayan preparatların sayısı 3 (37,5%), bir şiddetinde boyanan preparat sayısı 3 (37,5%), iki şiddetinde boyanan preparat sayısı 2 (25%), üç şiddetinde boyanan preparat sayısı 0 (0%) olarak saptandı.

KA+LPS grubundaki İNOS ile boyanma olmayan preparatların sayısı 2 (20%), bir şiddetinde boyanan preparat sayısı 6 (60%), iki şiddetinde boyanan preparat sayısı 1 (10%), üç şiddetinde boyanan preparat sayısı 1 (10%) olarak saptandı. İNOS'un epitelde dağılımı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. (p:0,472) (Tablo 4)

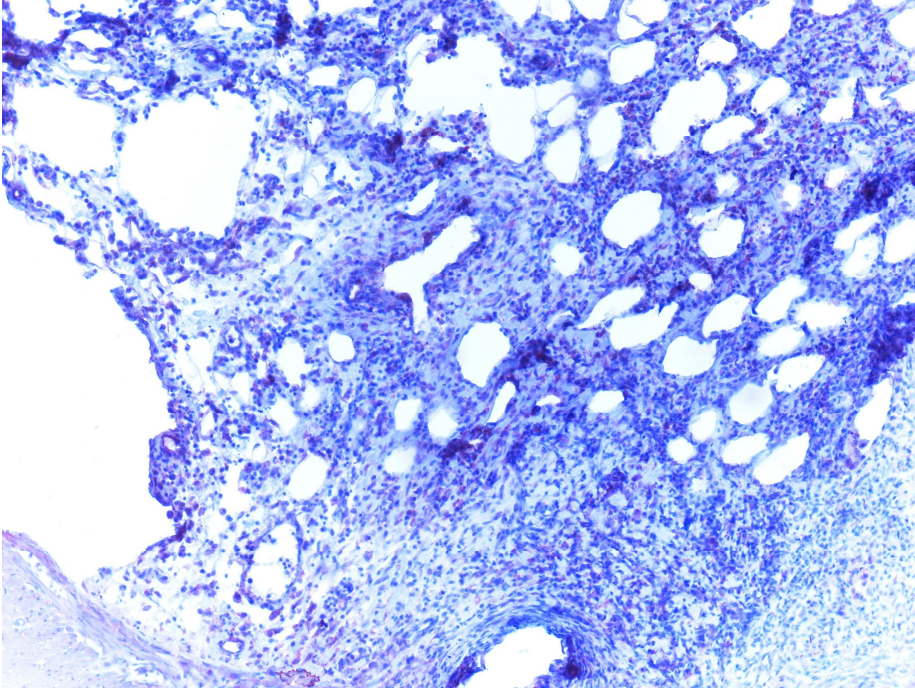
**Tablo 4.** İNOS ile epitelin değerlendirilmesi

H-E İnflamasyon Boyanma Şiddeti		Gruplar				Toplam
		KA	KA+HMB	KA+LPS+HMB	KA+LPS	
0	Sayı	0	3	3	2	8
	%	0,0%	30,0%	37,5%	20,0%	21,6%
1	Sayı	1	4	0	1	6
	%	11,1%	40,0%	0,0%	10,0%	16,2%
2	Sayı	7	2	3	4	16
	%	77,8%	20,0%	37,5%	40,0%	43,2%
3	Sayı	1	1	2	3	7
	%	11,1%	10,0%	25,0%	30,0%	18,9%
Toplam	Sayı	9	10	8	10	37
	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

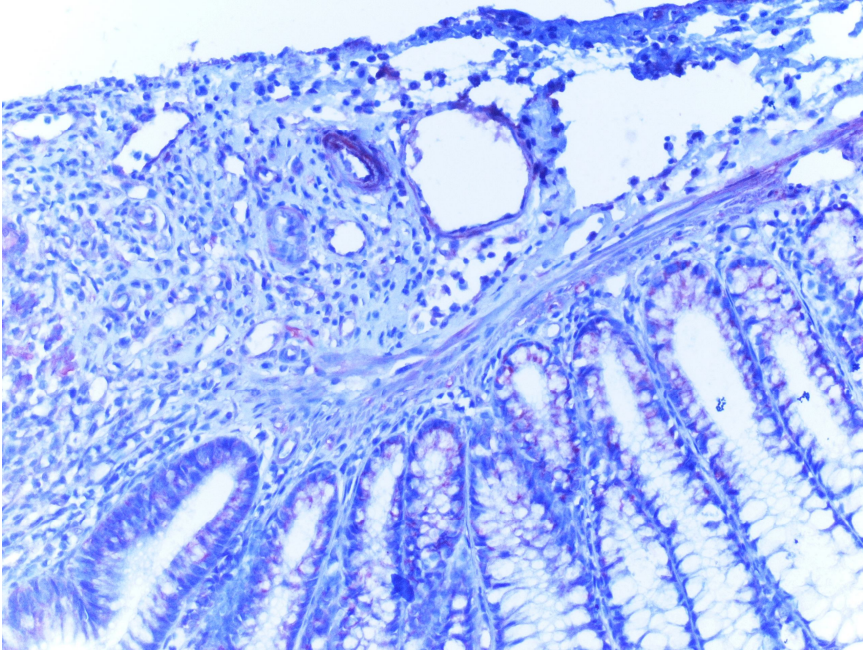
Resim 8, 9, 10 ve 11 de İNOS ile boyanmış olan KA grubu, KA+LPS grubu, KA+LPS+HMB grubu ve KA+HMB gruplarındaki epitelin boyanması gösterilmiştir.



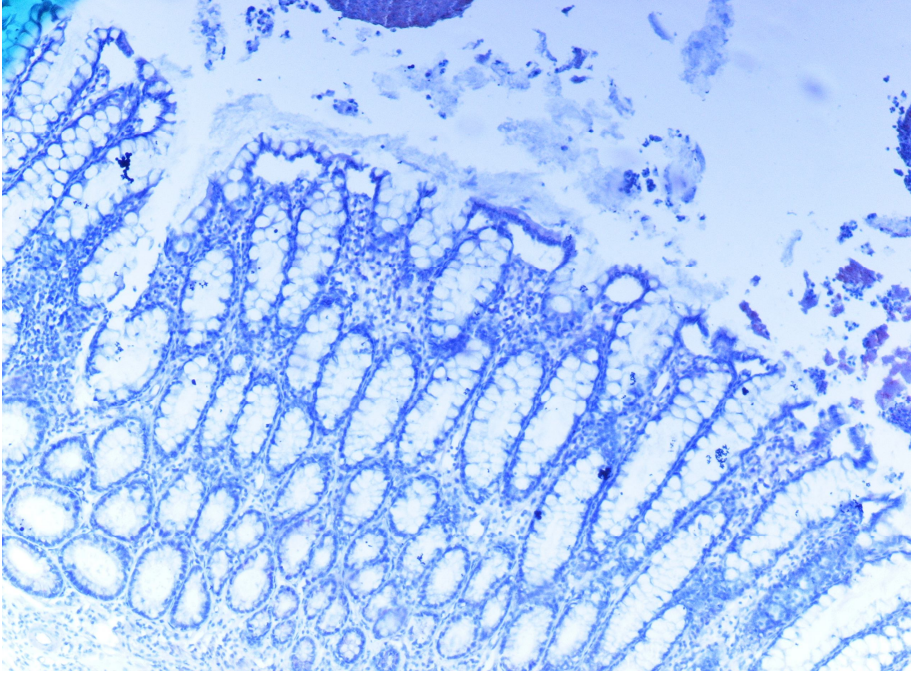
**Resim 8.** KA grubu Kolon epitelinde hafif şiddette boyanma (İNOS, 100X)



**Resim 9.** KA+LPS grubu Kolon epitelinde şiddetli boyanma (iNOS, 200X)



**Resim 10.** KA+HMB grubu: Kolon epitelinde hafif şiddette boyanma (iNOS, 200X)



**Resim 11.** KA+LPS+HMB grubu: Kolon epitelinde hafif şiddette boyanma (iNOS, 100X)

## TARTIŞMA

Yapılan çalışmalar bize göstermiştir ki distal kolon anastomozlarında kaçak %1.8-17 arasında görülmektedir ve bunun sonucunda görülen mortalite %6-50 arasında değişmektedir<sup>1-4</sup>. Divertikülit, tümör perforasyonu gibi intraabdominal septik durumlar kolon anastomoz kaçağı için risk oluşturmaktadır<sup>5</sup>. İntraabdominal enfeksiyon varlığında (divertikülit, tümör perforasyonu, jeneralize peritonit) altta yatan kolon hastalığının tedavisinde izlenecek yol halen tartışmalıdır<sup>6,7</sup>. Hastalıklı kolonu içerecek rezeksiyon ve primer anastomoz, rezeksiyon ve Hartman prosedürü veya rezeksiyon + primer anastomoz + proksimal stoma uygulanabilecek tedavi seçenekleridir<sup>8</sup>.

Hartman prosedürü divertikülit, tümör perforasyonu ve intraabdominal enfeksiyon gibi yüksek riskli durumların halen en çok tercih edilen tedavi seçeneğidir<sup>9</sup>. Ancak bu işlem sonrası stomaların %20-50'si kapatılmamaktadır ve bu stoma kapatılması işleminin postoperatif komplikasyon oranının primer anastomozdan daha fazla olduğu görülmüştür<sup>8</sup>.

Aşağı yerleşimli rektum anastomozlarında koruyucu stoma yapılması mortalitede değişikliğe neden olmadığı görülmüş olmasına rağmen anastomoz kaçak riskini azaltmaktadır. Bu nedenle anastomoz kaçaklarının neden olduğu artmış reoperasyon ihtiyacı dolaylı olarak azalmaktadır<sup>10</sup>. Diğer yandan koruyucu amaçlı yapılan stomaların kapatılması da bazı sorunları ortaya çıkarabilmektedir; bu işlemin mortalitesi %0.4 ve morbiditeside %17 düzeyindedir<sup>11</sup>. Tüm bu sorunlar değerlendirildiğinde, kolon rezeksiyonu gereken sepsisli hastalarda primer anastomozu düşük anastomoz kaçağı riski ile başarabilmek ve ilave cerrahi girişimleri azaltmak amaçlanmaktadır.

Son yıllarda, mevcut bilgiler ve çalışmaların ışığında anastomoz yönünden çok yüksek risk oluşturmayan uygun hastalarda tedavi tercihinin rezeksiyon ve primer anastomoz yapılması yönünde olduğu görülmektedir. Yüksek riskli hastalarda ise bu yöntemin güvenilirliği halen tartışmalıdır<sup>11</sup>.

Fast track cerrahi protokolü ile ilgili yapılmış olan birçok çalışmada postoperatif erken dönemde beslenmenin anastomoz kaçağı riskini arttırmadığı gösterilmiştir<sup>179-182</sup>. Bu protokol içerisinde postoperatif erken dönem beslenmesinde

bulunduğu birçok basamağı içeren bir cerrahi modalitedir. Fast track cerrahi protokolünün uygulandığı hastalarda: Daha küçük cerrahi insizyon, nazogastrik sonda uygulamasından kaçınılması, uygun analjezi ile takip, operasyon öncesi barsak hazırlığı yapılmaması, erken dönemde enteral beslenmenin başlanması şeklindedir<sup>179-182</sup>.

Biz çalışmamızı bir lösin metaboliti olan ve septik tabloda esansiyel hale gelen HMB'nin ratlarda LPS ile gerçekleştirilen sepsis modelinde anastomoz iyileşmesine etkisi olacağını düşünerek gerçekleştirdik. LPS kullanılarak septik peritonit, sepsis ve septik şok oluşturulabilmekte, sistemik inflamatuvar yanıt, multiorgan disfonksiyonu ve ölüm oluşabilmektedir<sup>82,104</sup>. Sepsis oluşturulmasında LPS modelinin seçilme nedeni intraperitoneal olarak uygulanan LPS'nin nispeten sabit doz bağımlı reaksiyonla tekrar üretilebilir inflamatuvar yanıt oluşturmasıdır<sup>15</sup>. Ayrıca LPS ile oluşturulan sepsis modeli acil kolon rezeksiyonun gerekli olabileceği inflamatuvar durumu taklit etmektedir<sup>15</sup>.

İnsanda sepsisin parametreleri; vücut ısısı  $> 38^{\circ}\text{C}$  veya  $<36^{\circ}\text{C}$ , kalp hızı  $>90/\text{dak}$ , solunum hızı  $>20/\text{dak}$  veya  $\text{PaCO}_2 <32 \text{ mmHg}$ , beyaz küre  $>12.000$ ,  $<4.000$  veya  $>\%10$  genç (çomak) hücrelerin olması şeklinde klasifiye edilmiştir. Ancak ratlarda LPS ile oluşturulan sepsis modelinde bunu ortaya koyacak belirgin parametreler mevcut değildir. Buna ilaveten kilo kaybı sepsisin fizyolojik kanıtlarından biri olarak kullanılmaktadır ve LPS de anlamlı kilo kaybına neden olmaktadır. Ancak LPS ile sepsis oluşturulan farelerde istatistiksel olarak anlamlı olmayan kilo kaybı oluşabileceği de gösterilmiştir<sup>15,153</sup>. Biz ratlarda LPS ile oluşturduğumuz sepsis modelinin güvenilirliğini, sepsis modeli oluşturulan ratların ağırlık kaybı, hidrokspirolin düzeyindeki anlamlı düşüklük, SOD düzeylerindeki farklılık ve MDA düzeyleri ile kanıtlamış bulunmaktayız. Ayrıca anastomoz patlama basınçlarında da septik model oluşturulmuş grupta belirgin bir değer düşüklüğü bu modelin doğru oluşturulmuş olduğunu bize göstermektedir.

Çalışmamızda öncelikle ratların operasyon öncesi ve sakrifikasyon öncesi ağırlıklarını değerlendirdiğimizde grupların ağırlıklarının homojen olduğunu saptadık. Öte yandan KA+LPS grubuna göre, KA+LPS+HMB grubunda görülen ağırlık artışının olması istatistiksel olarak anlam ifade etmese de HMB' nin etkili olabileceği konusunda bir gösterge olabilir.

Çalışmamızda anastomoz iyileşmesini fizyolojik, patolojik ve biyokimyasal olarak incelendi.

Anastomoz sonrası 120. saatte ölçülen anastomoz patlama basıncı anastomoz iyileşmesinin fonksiyonel göstergesi olarak kullanılmaktadır. Çünkü bu sürenin ötesine geçildiğinde anastomoz bölgesi dışındaki kolon segmentlerinde patlama ortaya çıkmaktadır<sup>174</sup>. Patlama basıncı hem kollajen birikimini hem de kollajen çapraz bağlanmasının yeterliliğini yansıtmaktadır; bu nedenle iyileşmenin fonksiyonel değerlendirmesinde uygun bir parametredir. LPS verilen ratlarda ve farelerde anastomoz sonrası 7. gündeki kolon anastomoz patlama basıncı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde düşük bulunmuştur<sup>14-16,153,156</sup>. Sepsiste patlama basıncının düşmesi nedeniyle LPS ile oluşturulan endotokseminin kolon anastomoz iyileşmesinde yetersizliğe neden olduğu gösterilmiştir<sup>15</sup>. Literatürde HMB ile anastomoz patlama basıncının ölçüldüğü bir çalışma bulunmamaktadır. Biz anastomoz patlama basınçları sonuçlarını değerlendirdiğimizde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da LPS ile oluşturulan sepsis modelinde anastomoz patlama basıncının düştüğünü gördük. HMB verilen grupta ise anastomoz patlama basıncının artmış olduğunu gördük. Fiziksel olarak HMB'nin anastomoz iyileşmesinde yararı olduğunu düşündük.

LPS uygulamasından sonra lökosit sayısında azalma ve lökopeni (6000–12000/mm<sup>3</sup>) oluşması sepsis göstergesi olarak kabul edilmektedir<sup>153,156</sup>. LPS lökopeni veya lökositoya neden olabilir<sup>159</sup>. LPS uygulamasından 18 saat sonra lökosit sayısında anlamlı azalma olduğu gösterilmiştir<sup>15,153</sup>. LPS uygulamasından sonra lökosit sayısında azalma ve lökopeni (6000–12000/mm<sup>3</sup>) oluşması sepsis göstergesi olarak kabul edilmektedir<sup>153,156</sup>. HMB'nin kullanıldığı önceki bir çalışmada lökosit sayısı bakımından anlamlı bir fark ifade etmediği gösterilmiştir<sup>166</sup>. Bizim çalışmamızda grupların lökosit sayıları değerlendirildiğinde gözlenen bu farklılık sadece HMB+KA ile LPS+KA grubu arasında ortaya çıkmaktadır. HMB+KA grubu LPS+KA grubuna göre istatistiksel fark önemli şekilde düşükken, diğer tüm gruplar birbirilerine benzerlik göstermektedir. HMB ile lökosit sayısı arasında direkt ya da dolaylı ilişki görülmemiştir.

MDA lipid peroksidasyonun ve doku hasarının göstergesidir. Septik şoktaki hastaların bir kısmında serum MDA düzeyleri yüksek olabilmektedir<sup>167</sup>. İnflame



kolon mukozasının LPS ile birlikte kültür edildiği in-vitro çalışmada LPS NO, MPO ve MDA'da yükselmeyle karakterize inflamatuvar yanıt oluşumuna neden olmuştur<sup>168</sup>. Kolon mukozasında belirgin oksidatif strese neden olan deneysel kolit modelinde kolonik MDA'da anlamlı yükselme saptanmıştır<sup>169</sup>. Çekal bağlama ve delme tekniğiyle oluşturulan polimikrobiyal sepsis kolon anastomozu çevresi dokuda MDA düzeyini yükseltmiştir<sup>164</sup>. Literatürde HMB'nin MDA düzeyleri ile ilgili yapılmış benzer bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda doku MDA düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı. Serum MDA düzeyleri açısından ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış olup İstatistiksel olarak gözlenen bu farklılık HMB+KA+LPS grubundan kaynaklanmaktadır. HMB+KA+LPS grubu diğer tüm gruplardan istatistik önemli şekilde yüksekken, diğer gruplar birbirlerine benzerlik göstermektedir. Sepsisteki metabolizma ve patolojyoloji kompleks olup tek bir değişken tarafından etkilenmemektedir. HMB'nin antioksidan etkisi literatürde gösterilmiş olmasına rağmen MDA seviyeleri üzerine bir etkisi ortaya konulamamış. Bizim çalışmamızda MDA seviyeleri üzerine bir etkisini göremedik.

Sepsis oksidatif strese neden olarak kolon anastomozu yara iyileşmesinde yetersizliğe neden olmaktadır<sup>17</sup>. Sitoplazmik enzim olan SOD süperoksit anyonunu parçalayarak hücre içeriğini okside edici aktiviteye karşı korur<sup>175</sup>. SOD oksidatif stresi ve inflamatuvar yanıtın mediatörlerinin aktivasyonunu azaltır<sup>163</sup>. SOD süperoksit anyon radikallerinin hidrojen peroksite dismutasyonunu hızlandıran önemli bir koruyucu sistemdir ve serbest radikallerin daha sonraki oluşumunu önleyerek asıl savunma görevi görür. LPS rat ileumunda MDA'yı artırıp SOD aktivitesini azaltmaktadır<sup>171</sup>. Deneysel kolit çalışmalarında antioksidan SOD ile ilgili elde edilen sonuçlar tartışmalıdır. Kuralay ve ark. deneysel kolit modelinde oksidatif strese yanıt olarak doku SOD düzeylerinin yükseldiğini ve antioksidan ajanlarla azaldığını gösterdi<sup>172</sup>. Ancak Dong ve ark. kolonik mukozada belirgin oksidatif strese neden olan asetik asit enema ile oluşturulan kolit modelinde kolonik SOD ativitesinde azalma olduğunu ve oksidatif stresi azaltıcı etkisi olan sodyum ferulatın azalmış olan SOD aktivitesini artırdığını gösterdi<sup>169</sup>. HMB'nin SOD aktivitesini arttırdığına dair literatürde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır<sup>177</sup>. Bizim çalışmamızda doku SOD düzeyleri incelendiğinde HMB'nin etkiliği olduğu düşünülmüştür. Bu düşüncemizi istatistiksel olarak LPS+KA+ HMB grubunda doku SOD düzeyinin yüksek olması ile kanıtlamaktayız. Aynı şekilde serum SOD

düzeyleri incelendiğinde yine HMB'nin etkili olduğu düşünülmüştür. Yine istatistiksel olarak LPS+KA+ HMB grubunda serum SOD düzeyleri anlamlı şekilde yüksektir.

LPS ile uyarılan sepsisin dahil olduğu immün ve inflamatuvar durumlar barsaklarda iNOS'u uyarır<sup>148</sup>. İNOS sepsis ve mukozal inflamasyon sırasında sitotoksik oranlara ulaşan NO salınımına neden olur<sup>149,150</sup>. Düşük konsantrasyonda NO kollajen sentezinde olumlu etkiye sahip olabilir ancak fazlalık durumunda toksik etki ortaya çıkarabilir. Endotoksinle oluşturulan sepsis modelinde olduğu gibi inflamatuvar yanıtın uyarılması fazla miktarda NO üretimine ve bunu takip eden doku hasarına neden olmaktadır<sup>14</sup>. NO'nun oksijenasyonu, nitrit ve nitrat stabil metabolitler oluşması ile sonuçlanır<sup>145</sup>. İntraabdominal sepsiste üretilen NO'yu ölçmek için perianastomotik dokuda NO'nun kararlı son ürünü olan nitrat-nitrit düzeyleri ölçülmektedir<sup>13</sup>. HMB ile nitritnitrat aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda doku nitrat-nitrit seviyeleri incelendiğinde HMB'nin etkili olduğunu düşünmekteyiz. LPS+KA+HMB grubunda istatistiksel olarak anlamlı farka yol açmıştır. Serum nitrat-nitrat düzeyleri incelendiğinde bu fark görülmemiştir.

MPO inflamasyonun göstergelerinden biridir ve çeşitli kolit modellerinde nötrofil infiltrasyonu ile iyi korelasyon göstermektedir<sup>163</sup>. Çekal bağlama ve delme tekniğiyle oluşturulan polimikrobiyal sepsis kolon anastomozu çevresi dokuda MPO düzeyinde yükselmeye neden olmaktadır<sup>164</sup>. Yine bu sepsis modelinde granülosit infiltrasyonundaki artış miyeloperoksidazda artışa karşılık gelmektedir<sup>168</sup>. Bununla birlikte nötrofil serin proteazı ve serbest oksijen radikalleri kolon anastomoz iyileşmesini olumsuz etkilemektedir<sup>165</sup>. HMB'nin MPO üzerine etkisi ile ilgili literatürde yapılmış bir çalışma mevcut değil. HMB' nin MPO seviyeleri üzerine etkisi olmadığı görülmekte.

LPS ile oluşturulan sepsis modellerinde TNF- $\alpha$  sepsis oluşumunun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır<sup>14,15,153,157</sup>. İntraperitoneal kaviteye verilen LPS sepsis modeli oluşturmaktadır; LPS inflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$ 'nın artışına neden olmaktadır<sup>104</sup>. LPS'in i.p. uygulanmasından 2 saat sonra plazma TNF- $\alpha$  düzeyi pik yapıp 24 saat sonra bazal düzeye ulaşmaktadır<sup>158</sup>. TNF- $\alpha$  lokal ve sistemik inflamasyonun bir çok kısmında yer alan proinflamatuvar bir sitokindir<sup>158</sup>. İntraperitoneal kaviteye verilen LPS ile oluşturulan sepsis modelinde

LPS TNF- $\alpha$ 'nın plazmada artışına neden olmaktadır<sup>104</sup>. LPS'in i.p. uygulanmasından 2 saat sonra plazma TNF- $\alpha$  düzeyi pik yapıp 24 saat sonra bazal düzeye ulaşmaktadır<sup>158</sup>. Operatif işlem inflamatuvar yanıtı artırdığı için inflamatuvar durum operatif işlemle şiddetlendirilebilir<sup>160,161</sup>. Normal kolon anastomozu iyileşmesinde yüksek doku TNF- $\alpha$  düzeyleri görülmemektedir. Kolon anastomozunda doku TNF- $\alpha$  düzeyi postoperatif 7. günde başlangıca göre anlamlı şekilde düşmektedir<sup>162</sup>. Bir başka çalışmada ise anastomoz sonrası TNF- $\alpha$  ekspresyonun hızlıca azaldığı ve 24 saat sonunda yok olduğu gösterilmiştir<sup>16</sup>. Öte yandan septik koşullarda cerrahi stres sonrası intestinal anastomozun yara iyileşmesi sürecinde TNF- $\alpha$  inhibitör faktör gibi etki edebilmektedir<sup>16</sup>. Sistemik olarak uygulanan LPS periferik kanda organ düzeyindeki sitokin (TNF- $\alpha$ ) içeriği ile korele olmayan sitokin cevabına neden olmaktadır<sup>157</sup>. Literatürde HMB ile yapılmış çalışmalarda TNF- $\alpha$  düzeylerini azalttığı gözlenmiştir<sup>124-127,128</sup>. Bizim çalışmamızda gruplar arasında istatistiksel olarak serum TNF- $\alpha$  düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmasa da HMB kullanan gruplarda serum TNF- $\alpha$  düzeylerinin diğer gruplara göre daha düşük olduğu gözlemlendi.

Kolon anastomoz segmentindeki postoperatif 7. gündeki hidroksiprolin konsantrasyonu kollajen birikiminin göstergesi olarak kullanılmaktadır<sup>16,173</sup>. Anastomoz çevresi doku hidroksiprolin düzeyinin anastomoz sonrası 7. günde LPS verilen ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu daha önce kanıtlanmıştır<sup>16,156</sup>. Sistemik sepsis, intraabdominal enfeksiyon olmadan kolon anastomozunda kollajen sentezini anlamlı şekilde azaltmaktadır<sup>14</sup>. HMB ile yapılan çalışmalarda ise hidroksiprolin düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir<sup>178</sup>. Bizim çalışmamızda dokuda gruplar arasında anlamlı bir fark göremedik. Serum hidroksiprolin düzeylerini incelediğimizde KA+HMB ile LPS+KA grupları arasındaki fark da istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Buda daha önce literatürde yapılmış çalışmalar ile bizim sonuçlarımızı örtüşmektedir. Ancak LPS+KA+HMB grubu ile LPS+KA grubu arasında fark olmamasının nedeni daha önce yapılan çalışmalarda HMB'nin beraberinde glutamin ve arjinin ile birlikte uygulanmış olması olabilir.

LPS ile oluşturulan sepsis ortamında yapılan kolon anastomozunun postoperatif 7. gündeki histopatolojik incelemesi ile ilgili farklı bulgular bildirilmiştir. H-E ile yapılan histopatolojik incelemede postoperatif 1. günde kolon anastomozu

bölgesinde polimorfonükleer lökosit ve makrofaj gibi inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunun LPS ile inhibe edildiği, postoperatif 7. günde ise kontrol grubu ile kıyaslandığında fark olmadığı gösterilmişti. Yine postoperatif 7. günde AZAN boyası ile kontrol grubuna göre LPS grubunda anastomoz bölgesinde kollajen liflerinde dejenerasyon ve düzensiz oluşum gözlenmişti<sup>156</sup>. Diller ve ark.'ın çalışmasında postoperatif 7. günde histopatolojik değişiklikler daha çok göze çarpmaktaydı. Sepsis grubuna kıyasla kontrol grubunda daha az granülosit bulunmaktaydı; sepsise kıyasla kontrol grubunda vasküler yoğunlukta artış mevcuttu<sup>15</sup>. KA ve KA+HMB gruplarının H-E inflamasyon skorlamaları incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya konulamamış olsa da KA grubunda iki ve üç şiddetinde boyanan preparat oranı %89,9 iken bu oran KA+HMB de %30 larda kalmaktadır. Bu da bize HMB'nin antioksidan etkisi sonucunda inflamasyonda azalmaya neden olduğunu gösterebilir. H-E ile fibrosizin değerlendirilmesinde ise KA gurunda iki ve üç şiddetindeki boyanma oranları %33,3 iken, bu oran KA+LPS+HMB grubunda %40 olarak görülmüştür. Bu preparatların sonuçları değerlendirildiğinde istatistiksel olarak bir anlam ifade etmese de HMB'nin fibrosizi bir miktar artırabileceğini gösterebilir.

İNOS gene ekspresyonu kolon anastomoz iyileşmesinde uyarılmaktadır ve iyileşmenin bütün fazlarında bulunmaktadır, ancak inflamatuvar fazda en fazladır. İNOS aktivitesi optimal iyileşme için gerekmektedir<sup>174</sup>.

Öte yandan LPS, TNF- $\alpha$  ve anastomoz bölgesindeki iNOS'u artırarak kolon anastomoz iyileşmesinin olumsuz etkilemektedir<sup>12,15,16</sup>. İnflamatuvar barsak hastalığında uygulanan intestinal alkalın fosfataz tedavisi ise kolonda iNOS boyanmasını ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunu azaltarak bağırsak duvarı morfolojisinde anlamlı iyileşme sağlamıştır<sup>175</sup>.

Diller ve ark.'ın LPS ile sepsis oluşturduktan sonra yaptığı anastomozunda postoperatif 2. günde iNOS ekspresyonu anastomozun merkezinde tespit edilmişti ve iNOS ekspresyonu sepsis grubunda daha belirgindi<sup>15</sup>. Kolondaki inflamatuvar bağırsak hastalıklarında kolon NO üretimi ile iNOS aktivitesi arasında uyumlu bir ilişki saptanmamıştır, NO'nun fazla olduğu durumda iNOS az, iNOS'un fazla olduğu durumda da NO az olabilmektedir<sup>176</sup>. Bununla birlikte iNOS ekspresyonunun immünohistokimyasal olarak ölçümünün yapılması gerçek NO üretimini ölçmekten daha kolay iken NO üretiminin değerlendirilmesinde iyi bir

ölçme yöntemi olmayabileceği bildirilmiştir<sup>170</sup>. Yani NO'yu ölçmek daha doğru sonuç verebilir. HMB'nin antioksidan etkileri bilinmesine rağmen literatürde İNOS ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. İNOS ile epitelin boyanması değerlendirildiğinde KA grubunda iki ve üç şiddetinde boyanan preparatların oranı %66,6 iken, KA+HMB grubunda bu oran %30 olarak görülmüştür. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı olmasa da HMB'nin antioksidan etkisi ile İNOS'u azalttığını gösterebilir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

SOD düzeylerindeki istatistiksel olarak anlamlı artışın varlığı HMB'nin antioksidan etkisi yönünden doğrulayıcı nitelikte olabilir. Anastomoz patlama basınçlarının HMB kullanılan gruplarda diğerlerine nazaran istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmuş olmasa da daha yüksek patlama değerleri vermesi yine HMB'nin doku iyileşmesinde etkin olabileceğini düşündürmüştür. Hidroksiprolin düzeyleri daha önce yapılmış pek çok çalışmada anlamlı bir parametre olarak değerlendirilmişken bizim çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiş olması daha önce yapılmış benzer çalışmalarda HMB'nin, glutamin ve arjinin ile kombine halde kullanılması olarak gösterilebilir.

Son dönemde fast track cerrahi protokolü ile ilgili yapılmış olan birçok çalışmada postoperatif erken dönemde beslenmenin anastomoz kaçağı riskini arttırmadığı gösterilmiştir<sup>179-182</sup>. Özellikle sepsisli hastalarda esansiyel hale gelen HMB'nin postoperatif erken dönemde enteral destek olarak verilmesi anastomoz kaçağı riskini azaltıp iyileşmeyi de önemli ölçüde destekleyecektir. Kliniklerde buna yönelik tedavi ve beslenme protokolleri geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Guenaga KF, Lustosa SA, Saad SS, Saconato H, Matos D. Ileostomy or colostomy for temporary decompression of colorectal anastomosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 24(1): 16-24.
2. Rullier E, Laurent C, Garrelon JL, Michel P, Saric J, Parneix M. Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer. *Br J Surg* 1998; 85(3):355–358.
3. Karanjia ND, Corder AP, Holdsworth PJ, Heald RJ. Risk of peritonitis and fatal septicemia and the need to defunction the low anastomosis. *Br J Surg* 1991;78: 196-8.
4. Dixon AR, Maxwell WA, Holmes JT. Carcinoma of the rectum: a 10-year experience. *Br J Surg* 1991; 78: 308-11.
5. Kingham TP, Pachter HL. Colonic anastomotic leak: risk factors, diagnosis, and treatment. *J Am Coll Surg* 2009;208(2):269-78.
6. Pieracci FM, Barie PS. Intra-abdominal infections. *Curr Opin Crit Care* 2007;13(4):440-9.
7. Regenet N, Pessaux P, Hennekinne S, et al. Primary anastomosis after intraoperative colonic lavage vs. Hartmann's procedure in generalized peritonitis complicating diverticular disease of the colon. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 503–507.
8. Constantinides VA, Heriot A, Remzi F, et al. Operative Strategies for Diverticular Peritonitis A Decision Analysis Between Primary Resection and Anastomosis Versus Hartmann's Procedures. *Ann Surg* 2007; 245(1): 94–103.
9. Abbas S. Resection and primary anastomosis in acute complicated diverticulitis, a systematic review of the literature. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 351–357.
10. Huser N, Michalski CW, Erkan M, et al. Systematic review and meta-analysis of the role of defunctioning stoma in low rectal cancer surgery. *Ann Surg* 2008; 248(1):52–60.

11. Chow A, Tilney HS, Paraskeva P, Jeyarajah S, Zacharakis E, Purkayastha S. The morbidity surrounding reversal of defunctioning ileostomies: a systematic review of 48 studies including 6,107 cases. *Int J Colorectal Dis* 2009;24(6): 711-23.
12. Diller R, Stratmann U, Minin E, et al. ATIII attenuates endotoxemia induced healing impairment in the colon. *J Surg Res* 2009;157(1):4-13.
13. Teke Z, Sacar S, Yenisey C, Atalay AO, Kavak T, Erdem E. Role of Activated Protein C on Wound Healing Process in Left Colonic Anastomoses in the Presence of Intra-abdominal Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture: An Experimental Study in the Rat. *World J Surg* 2008; 32: 2434–2443.
14. Thornton FJ, Ahrendt GM, Schaffer MR, Tantry US, Barbul A, Sepsis Impairs Anastomotic Collagen Gene Expression and Synthesis: A Possible Role for Nitric Oxide. *J Surg Res* 1997; 69, 81–86.
15. Diller R, Stratmann U, Helmschmied T, et al. Microcirculatory Dysfunction in Endotoxemic Bowel Anastomosis: The Pathogenetic Contribution of Microcirculatory Dysfunction to Endotoxemia-Induced Healing Impairment. *J Surg Res* 2008;150, 3–10.
16. Ishimura K, Moroguchi A, Okano K, Maeba T, Maeta H, Local Expression of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-10 on Wound Healing of Intestinal Anastomosis During Endotoxemia in Mice. *J Surg Res* 2002; 108, 91–97.
17. Sener G, Demiralp EE, Cetiner M, et al. L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. *C Bio. and Tox* 2006; 22: 47–60.
18. Zhang Z, Rathmacher J, Coates C, Nissen S. Occurrence of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate in foods and feeds. *FASEB J* 1994;8: A464
19. Wilson GJ, Wilson JM, Manninen AH. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on exercise performance and body composition across varying levels of age, sex, and training experience: a review. *Nutr Metab* 2008;5:1.
20. Vukovich MD, Stubbs NB, Bohlken RM. Body composition in 70-year old adults responds to dietary  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate similarly to that of young adults. *J Nutr* 2001;131:2049-2052.



21. Flakoll P, Sharp R, Baier S, Levenhagen D, Carr C, Nissen S. Effect of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate, arginine and lysine supplementation on strength, functionality, body composition, and protein metabolism in elderly women. *Nutrition* 2004; 20: 445-451.
22. Clark RH, Feleke G, Din M, et al. Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using  $\beta$ -hydroxy  $\beta$ -methylbutyrate, glutamine, and arginine: a randomised, double-blind, placebo controlled study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2000; 24:133-139.
23. May PE, Barber A, D'Olimpio JT, Hourihane A, Abumrad NN. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate, arginine, and glutamine. *Am J Surg* 2002;183:471-479.
24. Rackow EC. Clinical definition of sepsis and septic shock. In: Sibbald WJ, Sprung CL (eds) *New horizons: perspectives of sepsis and septic shock*. SCCM, Fullerton 1986; 1-9.
25. Bone RB, Grodzin CG, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1998; 112:235-243.
26. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C. Septic shock; advances in understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990;113:227-242.
27. Muckart DJJ, Bhagwanjee S. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definition of the systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. *Crit Care Med* 1997; 25: 1789-1795.
28. Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al; International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*. 2003;29(4):530-8.
29. Bone RC, Balk RA, Cerra FB et al. Sibbald WJ; ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest*. 2009 Nov;136(5 Suppl):e28.

30. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 1991; 338: 732–736.
31. Woltmann A, Hamann L, Ulmer AJ, Gerdes J, Bruch HP, Rietschel ET. Molecular mechanisms of sepsis. *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383: 2–10.
32. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 2000; 26 (Suppl 1): S64–S74.
33. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991; 99: 169–175.
34. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1993; 119: 771–778.
35. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL et al. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999; 180: 1584–1589.
36. Testini M, Margari A, Amoruso M, Lissidini G, Bonomo GM. The dehiscence of colorectal anastomoses: the risk factors. *Ann Ital Chir.* 2000;71(4):433-40.
37. Naycı A, Polat A, Çömelekoğlu Ü, Polat G, Renda N, Avlan D. The Role of Nitric Oxide on the Healing of Colonic Anastomoses in the Presence of Intra-abdominal Sepsis: an Experimental Study in Rats. *Ankara Cerrahi Dergisi* 2003; 17: 8-14.
38. Ahrendt GM, Gardner K, Barbul A. Loss of colonic structural collagen impairs healing during intra-abdominal sepsis. *Arch Surg* 1994;129:1179-83.
39. Ahrendt GM, Tantry U, Barbul A. Intra-abdominal sepsis impairs colonic reparative collagen synthesis. *Am J Surg* 1996;171:102-8.
40. Hogstrom H, Bondeson L, Haglund U. Neutrophilinduced decreases in wound margin strength after intestinal anastomoses: influence on collagen and mechanisms of granulocyte action. *Eur Surg Res* 1988; 20: 260-6.
41. Shandall AA, Williams GT, Hallett MB, Young HL. Colonic healing: a role for polymorpho nuclear leucocytes and oxygen radical production. *Br J Surg* 1986;73: 225-8.
42. Mimi Leong and Linda G, Philips MD. Wound healing. In: *Sabiston Textbook of Surgery*. 19. Baskı Philadelphia: WB Saunders Company, 2012; 1:151-175.

43. H. Peter Lorenz M.D. and Michael T. Longaker M.D. Wound Healing Repair Biology and Wound and Scar Treatment Mathes Plastic Surgery Vol. 1 General Principles 2. Baskı Philadelphia: WB Saunders Company, 2006: 1;209-230
44. Edward P Buchanan and H Peter Lorenz Wound Healing, Including Fetal Skin Healing Guyuron B. Eriksson E. Persing J.A. Plastic Surgery Indications And Practice Elsevier Saunders Elsevier Inc. 2009; 1:9-26
45. Geoffrey C. Gurtner Wound Healing: Normal and Abnormal Grabb and Smith's Plastic Surgery 6. Baskı Lippincott Williams and Wilkins 2007 1:15-23
46. Adrian Barbul and David T. Efron Wound Healing Schwartz's Principles of Surgery 9. Baskı McGraw-Hill Medical America 2010; 1:209-233
47. Witte M.B., Barbul A.; General principles of wound healing. Surg. Clin. North Am.1997; 77(3): 509-28
48. Brasken B. Healing of experimental colon anastomoses. Acta Chirurgica Eur J Surg Supp 1991; 566: 1-51.
49. Colak T, Nayci A, Polat G, Polat A, Comelekoglu U, Kanik A, et al. Effects of trapidil on the healing of colonic anastomoses in an experimental rat model. ANZ J Surg 2003;73(11):916-21.
50. Khoury GA, Waxman BP. Large bowel anastomoses. The healing process and sutured anastomoses. A review Br J Surg 1983;70: 61-63.
51. Hesp F, Hendriks T, Lubbers E-JC, DeBoer HHM. Wound healing in the intestinal wall. A comparison between experimental ileal and colonic anastomoses. Dic Colon Rectum 1984; 27: 99-104.
52. Tronton F, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. Surg Cli N Am 1997; 77(3): 549-573.
53. Regan MC and Barbul A (1994). The cellular biology of wound healing, in "Wound Healing" Editors, Schlag G, Redl H, Vol:1 pp: 3-17 Springer-Verlag Berlin.
54. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. The effect of suture technic on collagen concentration in the colonic wall Am J Surg 1978; 135: 333-340.

55. Irvan TT, Hunt TK. Reappraisal of the healing process of anastomoses of the colon. *Surg Gynecol Obstet* 1974; 138: 741-746.
56. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses III. Collagen metabolism in the colon after left colon resection. *Am J Surg* 1980; 139: 398-405.
57. Högström H, Haglund U. Early decrease in suture line breaking strength. The effect of proposed collagenase inhibition. *Res Exp Med* 1985; 185: 451-455.
58. Crowcat NL, Svage FJ, Lewin MR, Boulus PB. Direct measurement of collagenase in colonic anastomosis. *Br J Surg* 1990; 77: 1284-1287.
59. Hawley PR, Faulk WP, Hunt TK, Dunphy JE. Collagenase activity in the gastrointestinal tract. *Br J Surg*. 1970; 57(12): 896-900.
60. Oyamada I, Kitaoka M, Araki C, Yoshioka H, Usuku G. Collagenase from the culture medium of rabbit colon wall with special reference to the latent type and substrate specificity. *Gastroenterology* 1983; 85(2): 376-384
61. Crowcat NL, Svage FJ, Hembry RM, Boulus PB. Role of collagenase in colonic anastomoses: a reappraisal. *Br J Surg* 1988; 75: 330-334.
62. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses I. Bursting strength of the colon after left colon resection and anastomosis. *Am J Surg* 1987; 136: 587-594.
63. FASTER ME, Laycock JRD, Silver IA, Leaper DJ. Hypovolaemia and healing in colonic anastomoses. *Br J Surg* 1985; 72: 831-834.
64. Goligher JC, Graham NG, Dombal FT. Anastomotic dehiscence after anterior resection of rectum and sigmoid. *Br J Surg* 1970; 57(2): 109-118.
65. Nikaido H, Vaara M. Outer membrane. In: Neidhardt FC (ed). *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Washington DC: American Society for Microbiology, 1987; 7-22.
66. Hayashi S, Wu HC. Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 1990; 22: 451-471.
67. Dmitriev BA, Ehlers S, Rietschel ET. Layered murein revisited: a fundamentally new concept of bacterial cell wall structure, biogenesis and function. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1999; 187: 173-181.

68. Rietschel ET, Brade H, Holst O, et al. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 216: 39–81.
69. Holst O, Ulmer AJ, Brade H, Flad HD, Rietschel ET. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996; 16: 83–104.
70. Zähringer U, Lindner B, Rietschel ET. Chemical structure of lipid A: recent advances in structural analysis of biologically active molecule. In: Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrisson DC (eds). *Endotoxin in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker, 1999; 93–114.
71. Schumann RR, Leong SR, Flagg GW, et al. Structure and Function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249:1429–1431.
72. Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein and CD 14 in LPS-dependent macrophage activation. *Immunobiol* 1993; 187:227–232.
73. Margaretten W, McKay DG: Thrombotic ulcerations of the gastrointestinal tract. *Arch Intern Med* 1971; 127:250–253.
74. Rietschel ET, Brade H, Holst O, et al. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response and immunological detoxification. In: Rietschel ET, Wagner H(eds). *Pathology of Septic Shock*. Berlin: Springer-Verlag. 1996;40–81.
75. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249:1431–1433.
76. Ziegler-Heitbrock HWL, Ulevitch RJ. CD14, cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 1993; 14: 121–125.
77. Marsh CB, Wewers MD. The pathogenesis of sepsis. *Clin Chest Med* 1996; 17: 183–197.
78. Haziot A, Chen S, Ferrero E. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol*, 1988; 141:547–552.
79. O’Neil S, Hunt J, Filkins J, et al. Obstructive jaundice in rats results in exaggerated hepatic production of tumor necrosis factor-alpha and systemic

- and tissue tumor necrosis factor-alpha levels after endotoxin. *Surgery* 1997; 122: 281–286.
- 80.** Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann Tr, Howard M, O'Garra A. Interleukin–10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147:3815–3822.
- 81.** Pain JA, Cahil CJ, Bailey ME. Perioperative complications in obstructive jaundice: therapeutic considerations. *Bri J Surg* 1985; 72: 942–945.
- 82.** Alexander C, Rietschel ET, Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of Endotoxin Research* 2001; 7: 167-202.
- 83.** Beaux AC, Goldie AS, Ross JA, Carter D, Fearon KCH. Serum concentrations of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. *Bri J Surg* 1996; 83: 349–353.
- 84.** Roumen RMH, Hendricks T, Van der Ven-Jongekrijg J, et al. Cytokine patterns in patients after major surgery hemorrhagic shock and severe blunt trauma. *Ann Surg* 1993; 218:769–776.
- 85.** Sayan M, Alponat A, Yavuz N, Altinkaya E, Göksel S, Sariyar M. The effect of oral sodium taurocholate on endotoxemia and intestinal anastomotic wound healing in rats with obstructive jaundice. *JPN J Surg* 1997;27: 953–957.
- 86.** Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2744–2748.
- 87.** Loppnow H, Stelter F, Schönbeck U, et al. Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *Infect Immun* 1995; 63: 1020–1026.
- 88.** Helfgott DC, May LT, Sthoeger Z, Tamm I, Sehgal PB. Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts. *J Exp Med* 1987; 166: 1300–1309.
- 89.** O'Connor MJ, Sumner HW, Schwartz ML. The clinical and pathologic correlations in mechanical biliary obstruction and acute cholangitis. *Ann Surg* 1982; 195:419–423.

90. Scott-Conner CEH, Grogan JB. The pathophysiology of biliary obstruction and its effect on phagocytic and immune function. *J Surg Res* 1994; 57:316–336.
91. Talmadge JE, Bowersox O, Tribble H, Lee SH, Shepard M, Liggitt D: Toxicity of tumor necrosis factor is synergistic with gamma interferon and can be reduced with cyclooxygenase inhibitors. *Am J Pathol* 1987; 128:410–425.
92. Dixon JM, Armstrong CP, Duffy SW, Elton RA, Davies GC. Upper gastrointestinal bleeding. A significant complication after surgery for relief of obstructive jaundice. *Ann Surg* 1984;199:271–275.
93. Dixon JM, Armstrong CP, Duffy SW, Davies GC. Factors affecting morbidity and mortality after surgery for obstructive jaundice: a review of 373 patients. *Gut* 1983; 24: 845–852. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; 234:470–473.
94. Bemelmans MHA, Gouma DJ, Greve JWM, Burman WA. Cytokines tumor necrosis factor and interleukin-6 in experimental biliary obstruction in mice. *Hepatology* 1992;15: 1132–1136.
95. Inan M, Sayek I, Tel BC, Erdemli SI. Role of endotoxin and nitric oxide in the pathogenesis of renal failure in obstructive jaundice. *Bri J Surg* 1997;84: 943–947.
96. Fletcher MS, Westwick J, Kakkar VV. Endotoxin, prostoglandins and renal fibrin deposition in obstructive jaundice. *Bri J Surg* 1982; 69: 625–629.
97. Allison MEM, Prentice CRM, Kennedy AC, Blumgart LH. Renal function and other factors in obstructive jaundice. *Bri J Surg* 1979; 66: 392–397.
98. Greig JD, Krukowski ZH, Matheson NA. Surgical morbidity and mortality in one hundred and twenty-nine patients with obstructive jaundice. *Bri J Surg* 1988; 75: 216–219.
99. Kawaguchi K, Koike M. Glomerular alterations associated with obstructive jaundice. *Human Pathol* 1987; 18: 1149–1154.
100. Lee E. The effect of obstructive jaundice on the migration of reticuloendothelial cells and fibroblasts into early experimental granulomata. *Bri J Surg* 1972; 59: 875–877.
101. Wardle EN. Endotoxin and acute renal failure. *Nephron* 1975; 14: 321–332.

102. Hurley J, Levin J. The relevance of endotoxin detection in sepsis. In: Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrisson DC (eds). *Endotoxin in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker 1999; 841–854.
103. Mannel DN. Advances in sepsis research derived from animal models. *International JMM* 2007;297: 393–400
104. Pirlich M, Schütz T, Kemps M, et al. Social risk factors for hospital malnutrition. *Nutrition*. 2005;21: 295-300.
105. Forster S, Gariballa S. Age as a determinant of nutritional status: a cross sectional study. *Nutr J*.2005;4: 28.
106. Guigoz Y, Lauque S, Vellas BJ. Identifying the elderly at risk for malnutrition: the Mini Nutritional Assessment. *Clin Geriatr Med*. 2002;18: 737-757.
107. Roubenoff R. Sarcopenia: effects on body composition and function. *J Gerontol*. 2003;58A:1012-1017.
108. Demling RH. Nutrition, anabolism, and the wound healing process: an overview. *Eplasty*. 2009;9:65-94.
109. Vukovich MD, Stubbs NB, Bohlken RM. Body composition in 70-year old adults responds to dietary  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate similarly to that of young adults. *J Nutr*. 2001;131:2049-2052.
110. Kuhls DA, Rathmacher JA, Musngi D, et al.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate supplementation in critically ill trauma patients. *J Trauma*. 2007;62:125-132.
111. Hsieh LC, Chien SL, Huang MS, Tseng HF, Chang CK. Anti-inflammatory and anticatabolic effects of short-term  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate supplementation on chronic obstructive pulmonary disease patients in intensive care unit. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2006;15:544-550.
112. Nissen SL, Abumrad NN. Nutritional role of the leucine metabolite  $\beta$ -hydroxy  $\beta$ -methylbutyrate (HMB). *J Nutr Biochem*. 1997;8:300-311.
113. Williams JZ, Barbul A. Nutrition and wound healing. *Surg Clin North Am*. 2003;83:571-596.
114. May ME, Buse MG. Effects of branched-chain amino acids on protein turnover. *Diabetes Metab Rev*.1989;5:227-245.



115. Manzano M, Giron MD, Salto R, Sevillano N, Rueda R, Lopez-Pedrosa JM. Is  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) the bioactive metabolite of L-leucine (LEU) in muscle? Molecular evidence and potential implications. Abstract presented at: European Society for Clinical Nutrition and Metabolism 31st Congress; Vienna, Austria; August 29-September 1, 2009. Abstract P267)
116. Alon T, Bagchi D, Preuss HG. Supplementing with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) to build and maintain muscle mass: a review. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2002;111:139-152.
117. Nissen S, Sharp R, Ray M, et al. Effect of leucine metabolite  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *J Appl Physiol*. 1996;81:2095-2104.
118. Smith HJ, Mukerji P, Tisdale MJ. Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer Res*. 2005;65:277-283.
119. Smith HJ, Wyke SM, Tisdale MJ. Mechanism of the attenuation of proteolysis-inducing factor stimulated protein degradation in muscle by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate. *Cancer Res*. 2004;64:8731-8735.
120. Nissen SL, Abumrad NN. Nutritional role of the leucine metabolite  $\beta$ -hydroxy  $\beta$ -methylbutyrate (HMB). *J Nutr Biochem*. 1997;8:300-311.
121. Nissen S, Sharp R, Ray M, et al. Effect of leucine metabolite  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *J Appl Physiol*. 1996;81:2095-2104
122. Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Mechanism of attenuation of muscle protein degradation induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  and angiotensin II by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295:E1417-E1426.
123. Yeh SS, Blackwood K, Schuster MW. The cytokine basis of cachexia and its treatment: are they ready for prime time? *J Am Med Dir Assoc*. 2008;9:219-236.
124. Kornasio R, Riederer I, Butler-Browne G, Mouly V, Uni Z, Halevy O.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) stimulates myogenic cell proliferation,

differentiation and survival via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793:755-763.

125. Hsieh LC, Chien SL, Huang MS, Tseng HF, Chang CK. Anti-inflammatory and anticatabolic effects of short-term  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate supplementation on chronic obstructive pulmonary disease patients in intensive care unit. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2006;15:544-550.
126. Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Attenuation of depression of muscle protein synthesis induced by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and angiotensin II by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295:E1409-E1416.
127. Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Mechanism of attenuation of muscle protein degradation induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  and angiotensin II by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295:E1417 E1426.
128. Eley HL, Russell ST, Baxter JH, Mukerji P, Tisdale MJ. Signaling pathways initiated by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate to attenuate the depression of protein synthesis in skeletal muscle in response to cachectic stimuli. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293:E923-E931.
129. Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:335-348.
130. Bales CW, Ritchie CS. Sarcopenia, weight loss, and nutritional frailty in the elderly. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:309-323.
131. Paddon-Jones D, Short KR, Campbell WW, Volpi E, Wolfe RR. Role of dietary protein in the sarcopenia of aging. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(suppl):1562S-1566S.
132. Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato K. Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr* 1991;53: 201–205.
133. Şehirli AÖ, Sener G, Satiroğlu H, Ayanoğlu-Dülger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in rat *J Nephrol* 2003; 16: 75-80.

134. Şener G, Şehirli AÖ, Satiroğlu H, Keyer UM, Yeğen BC. Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Burns* 2002; 28: 419–425.
135. Youn YK, Suh GJ, Jung SE, Oh SK, Demling R. Recombinant human growth hormone decreases lung and liver lipid peroxidation and increases antioxidant activity after thermal injury in rats. *J Burn Care Rehabil* 1998; 19: 542–548.
136. Yagi K. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. In: D. Armstrong (eds). *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. Plenum Press, New York: 1994: 1-15.
137. Cuzzucrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP. Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia reperfusion injury *Cardiovasc Res* 2000; 47,537–548.
138. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. 1994; 307(4): 284-292.
139. Sun YI, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinically assay of superoxide dismutase. *Clin Chemistry* 1988; 34(3): 497-500.
140. Demir S, Erden MI. Pentoxifylline and N-acetylcystein in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clinica Chimica Acta* 1998; 275: 127-135.
141. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271:c1424-37.
142. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *Faseb J* 1995;9: 1319-30.
143. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* 1992;6: 3051.
144. Marletta MA. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol* 1988;1: 249-57.
145. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals *Biochem J* 1994;298:249.
146. Albina JE. On the expression of nitric oxide synthase by human macrophages. Why no NO? *J Leukoc Biol* 1995; 58: 643-9.

147. Boughton-Smith NK, Evans SM, Whittle BJ, Moncada, S. Induction of nitric oxide synthase in rat intestine and its association with tissue injury. *Agents Actions* 38:Spec C1993;125.
148. Xie Q, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation *J Leukocyte Biol*1994;56:576.
149. Seago ND, Clark DA, Miller MJ. Role of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and peroxynitrite in gut inflammation. *Inflamm Res*.1995;44(Suppl.2):S153.
150. Shi HP, Efron DT, Most D, Tantry US, Barbul A. Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice *Surgery* 2000; 128(2): 374-378.
151. Efron DT, Most D, Shi HP, Tantry US, Barbul A. Modulation of growth factor and cytokine expression by nitric oxide during rat colon anastomotic healing. *J Gastrointestinal Surg* 2003;7(3):393-9.
152. Diller R, Stratmann U, Minin E, et al. ATIII Attenuates Endotoxemia Induced Healing Impairment in the Colon. *JSS* 2009; 1–10.
153. Golowich SP, Kaplan SD. *Methods in enzymology. Vol. II.* New York: Academic Press, 1955; 769.
154. Durak I, Canbolat O, Kavutcu M, Öztürk HS, Yurtarslan Z. Activities of total, cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. *J Clin Lab Anal* 1996;10: 17–20.
155. Ishimura K, Tsubouchi T, Okano K, et al. Wound Healing of Intestinal Anastomosis after Digestive Surgery under Septic Conditions: Participation of Local Interleukin-6 Expression. *World J Surg* 1998;22: 1069–1076.
156. Ebdrup L, Krog J, Granfeldt A, et al. Leukocyte, plasma, and organ-associated cytokine profiles in an animal model of acute inflammation. *APMIS* 2008; 116: 352–360.
157. Schünemann HJ, Jaeschke R, Cook DJ, et al. On behalf of the ATS Documents Development and Implementation Committee: An official ATS statement: Grading the quality of evidence and strength of recommendations in ATS guidelines and recommendations *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:605–61.

- 158.** Famularo G, De Simone C, Heidelberg G. Carnitine deficiency: primary and secondary syndromes. In *Carnitine Today* Landes Bioscience. Austin TX 1997; 119–161.
- 159.** Hiki N, Shimizu N, Imamura K, et al. Manipulation of the small intestine as a cause of increased inflammatory response after open compared with laparoscopic surgery. *Br J Surg* 2006; 93: 195.
- 160.** Jacobi CA, Zieren HU, Sabat R, et al. Comparison of local and systemic inflammation after laparotomy or laparoscopy in the rat sepsis model. *Langenbecks Arch Chir* 1997;382(4 Suppl 1):S9.
- 161.** Zubaidi A, Buie WD, Hart DA, Sigalet D, Temporal Expression of Cytokines in Rat Cutaneous, Fascial, and Intestinal Wounds: A Comparative Study. *Dig Dis Sci* 2010; 55(6): 1581-1588.
- 162.** Uchimura K, Nagasaka A, Hayashi R, et al. Changes in superoxide dismutase activities and concentrations and myeloperoxidase activities in leukocytes from patients with diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 1999;13(5-6):264–270.
- 163.** Aytekin FO, Teke Z, Aydin C. Effects of a membrane-permeable radical scavenger, Tempol, on healing of colonic anastomoses in the cecal ligation and puncture model of polymicrobial sepsis in rats. *AJS* 2007;193: 723–729
- 164.** Yamaguchi Y, Hisama N, Okajima K, et al. Pretreatment with activated protein C or active human urinary thrombomodulin attenuates the production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia/reperfusion in rat liver. *Hepatology* 1997; 25: 1136–1140.
- 165.** Nissen S, Sharp RL, Panton L, Vukovich M, Trappe S, Fuller JC Jr.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) supplementation in humans is safe and may decrease cardiovascular risk factors. *J Nutr.* 2000; 130:1937-1945
- 166.** Goode, Helen F. Fimls P, et al. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Critical Care Medicine.* 1995;23(4):646-651.
- 167.** Mei Q, Xu JM, Xiang L, Hu YM, Hu XP, Xu ZW. Change of nitric oxide in experimental colitis and its inhibition by melatonin in vivo and in vitro. *Postgrad Med J* 2005;81: 667–672.

168. Dong WG, Liu SP, Yu BP, Wu DF, Luo HS, Yu JP. Ameliorative effects of sodium ferulate on experimental colitis and their mechanisms in rats. *World J Gastroenterol* 2003;9(11):2533–2538.
169. Leonard N, Bishop AE, Polak JM, Talbot IC. Expression of nitric oxide synthase in inflammatory bowel disease is not affected by corticosteroid treatment *J Clin Pathol* 1998;51: 750-753.
170. Yang TC, Zhang SW, Sun LN, Wang H, Ren AM. Magnolol attenuates sepsis-induced gastrointestinal dysmotility in rats by modulating inflammatory mediators. *World J Gastroenterol*. 2008;14(48):7353-60.
171. Kuralay F, Yildiz C, Ozutemiz O, et al. Effects of trimetazidine on acetic acid-induced colitis in female Swiss rats. *J Toxicol Environ Health A* 2003;66 (2):169–179.
172. Christensen H, Langfelt S, Laurberg S. Bursting. Strength of Experimental Colonic Anastomoses-A Methodological Study. *Eur Surg Res*1993;25(1):38-45.
173. Efron DT, Thornton. FJ, Steulten C, et al. Expression and function of inducible nitric oxide synthase during rat colon anastomotic healing. *Journal of Gastrointestinal Surgery*.1999;3: 592-601.
174. Tuin A, Poelstra K, de Jager-Krikken A, et al. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut* 2009;58(3):379-87.
175. Rachemilewitz D, Stampler JS, Bachwich D, et al. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 1995; 36: 718-23.
176. Yanlei Hao, Janna R. Jackson, Yan Wang, Neile Edens, Suzette L. Pereira, Stephen E.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate reduces myonuclear apoptosis during recovery from hind limb suspension-induced musclefiber atrophy in aged rats *Alway Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011; 301(3): R701–R715.
177. Williams JZ, Abumrad N, Barbul A. Effect of a specialized amino acid mixture on human collagen deposition. *Ann Surg*. 2002;236:369-375.

- 178.** Lewis SJ, Egger M, Sylvester PA et al. Early enteral feeding versus nil per mouth after gastrointestinal surgery: systematic review and meta analyses of controlled trials. *Br Med J* 2001; 323: 773-776
- 179.** Watters JM, Kirkpatrick SM, Norris SB et al. immediate postoperative enteral feeding results in impaired respiratory mechanics and decreased morbidity. *Ann Surg* 1997; 226: 369-380
- 180.** Beattie AH, Prach AT, Baxter JP et al. a randomized controlled trial evaluating the use of enteral nutritional supplements postoperatively in malnourished surgical patients. *Gut* 2000; 46: 813-818
- 181.** Kehlet H, Wilmore DW: Evidence-based surgical care and the evolution of fast-track surgery. *Ann Surg* 2008;248:189-198.
- 182.** De Sousa JB, Soares EG, Aprilli F. Effects of diclofenac sodium on intestinal anastomotic healing. Experimental study on the small intestine of rabbits. *Dis Colon Rectum*. 1991;34(7):613-7.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AIDS</b>	<b>: Acquired immuno deficiency syndrome</b>
<b>ATP</b>	<b>: Adenozintrifosfat</b>
<b>β</b>	<b>: Beta</b>
<b>DiC</b>	<b>: Dissemine intravascular coagulation</b>
<b>EGF</b>	<b>: Epidermal growth faktör</b>
<b>ELİSA</b>	<b>: Enzim linked immunoassay</b>
<b>HIV</b>	<b>: Human immun deficiency virus</b>
<b>FGF</b>	<b>: Fibroblast growth faktör</b>
<b>F</b>	<b>: French</b>
<b>GAG</b>	<b>: Glikozaminoglikanlar</b>
<b>Gpi</b>	<b>: Glikozilfosfoinozitol</b>
<b>HETAAB</b>	<b>: Hekza Adezil Trimetil Amonyum Bromid</b>
<b>H-E</b>	<b>: Hematoksilen-eozin</b>
<b>HMB</b>	<b>: β – hidroksi β – metilbutirat</b>
<b>IL-1</b>	<b>: İnterlökin 1</b>
<b>IFN-γ</b>	<b>: İnterferon-gamma</b>
<b>İNOS</b>	<b>: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz</b>
<b>İ.P</b>	<b>: İnteraperitoneal</b>
<b>KA</b>	<b>: Kolon Anastomozu</b>
<b>KIC</b>	<b>: a-ketoisocaproat</b>
<b>KoA</b>	<b>: Koenzim-A</b>
<b>KOAH</b>	<b>: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı</b>
<b>LBP</b>	<b>: lipoprotein bağlayıcı protein</b>
<b>LPS</b>	<b>: Lipopolisakkarit</b>
<b>MDA</b>	<b>: Malondialdehit</b>
<b>MPO</b>	<b>: Miyeloperoksidaz</b>



<b>mTOR</b>	<b>: Mammalian target of rapamisin</b>
<b>NR</b>	<b>: Nitrat redüktaz</b>
<b>NO</b>	<b>: Nitrik oksit</b>
<b>NOS</b>	<b>: Nitrik oksit sentaz</b>
<b>NBT</b>	<b>: Nitroblue tetrazoluim</b>
<b>OCTN2</b>	<b>: Organik katyon taşıyıcısı</b>
<b>OKT-1</b>	<b>: all-T-cell marker</b>
<b>PAF</b>	<b>: Platellet activated growth faktör</b>
<b>PDGF</b>	<b>: Platellet derivated growth faktör</b>
<b>PIF</b>	<b>: Proteolizis-ilişkili faktör</b>
<b>PMNL</b>	<b>: Polimorfonükler lökositler</b>
<b>S.K</b>	<b>: Subkutan</b>
<b>SOD</b>	<b>: Süperoksit Dismutaz</b>
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	<b>: Transforming growth faktör alfa</b>
<b>TGF<math>\beta</math></b>	<b>: Transforming growth faktör beta</b>
<b>TNF</b>	<b>: Tümör nekroz faktörü</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>: Tümör nekroz faktör alfa</b>
<b>YVK</b>	<b>: Yağsız vücut kitesi</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekiller</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 1</b> ( Yara iyileşmesi süreklilik diyagramı)	12
<b>Şekil 2</b> (HMB'nin kimyasal yapısı)	27
<b>Şekil 3</b> (HMB'nin metabolizma yolağı)	28
<b>Şekil 4</b> (Ratların deney sürecindeki ağırlık değişimleri)	43
<b>Şekil 5</b> (Kolon anastomoz patlama basıncı ile ilgili grafik)	45
<b>Şekil 6</b> (Lökosit sayımı ile ilgili grafik)	46
<b>Şekil 7</b> (Doku MDA ile ilgili grafik)	46
<b>Şekil 8</b> (Serum MDA ile ilgili grafik)	47
<b>Şekil 9</b> (Doku SOD aktivitesi ile ilgili grafik)	48
<b>Şekil 10</b> (Serum SOD aktivitesi ile ilgili grafik)	49
<b>Şekil 11</b> (Doku Nitrit-Nitrat düzeyleri ile ilgili grafik)	49
<b>Şekil 12</b> (Serum Nitrit-Nitrat düzeyleri ile ilgili grafik)	50
<b>Şekil 13</b> (Doku MPO düzeyleri ile ilgili grafik)	50
<b>Şekil 14</b> (Serum MPO düzeyleri ile ilgili grafik)	51
<b>Şekil 15</b> (Doku TNF- $\alpha$ ile ilgili grafik)	52
<b>Şekil 16</b> (Serum TNF- $\alpha$ düzeyleri)	52
<b>Şekil 17</b> (Doku Hidroksiprolin düzeyleri ile ilgili grafik)	53
<b>Şekil 18</b> (Serum Hidroksiprolin düzeyleri ile ilgili grafik)	54

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablolar</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b> (Ratlara ait ağırlık değerleri)	43
<b>Tablo 2</b> (H-E ile inflamasyonun değerlendirilmesi)	55
<b>Tablo 3</b> (H-E ile fibrosizin değerlendirilmesi)	56
<b>Tablo 4</b> (İNOS ile epitelin değerlendirilmesi)	59

## RESİMLER DİZİNİ

Resimler	Sayfa No
<b>Resim 1</b> (İnen kolona kesi sonrası anastomoz)	34
<b>Resim 2</b> (Anastomoz patlama basıncı ölçüm tekniği)	35
<b>Resim 3</b> (Patlama basıncı ölçüm düzeneği)	36
<b>Resim 4</b> (KA grubu Kolon epitelinde hafif şiddetli inflamasyon ve hafif şiddette fibrozis(HE, 40X))	56
<b>Resim 5</b> (KA+LPS grubu Kolon epitelinde orta şiddette kronik inflamasyon ve fibrozis(HE, 40X))	57
<b>Resim 6</b> (KA+HMB grubu: Kolon epitelinde hafif şiddetli kronik inflamasyon ve orta şiddette fibrozis(HE, 40X))	57
<b>Resim 7</b> (KA+HMB grubu: Kolon epitelinde hafif şiddetli kronik inflamasyon ve orta şiddette fibrozis (HE, 40X))	58
<b>Resim 8</b> (KA grubu Kolon epitelinde hafif şiddetli boyanma (İNOS, 100X))	59
<b>Resim 9</b> (KA+LPS grubu Kolon epitelinde şiddetli boyanma (İNOS, 200X))	60
<b>Resim 10</b> (KA+HMB grubu: Kolon epitelinde hafif şiddetli boyanma (İNOS, 200X))	60
<b>Resim 11</b> (KA+LPS+HMB grubu: Kolon epitelinde hafif şiddetli boyanma (İNOS, 100X))	61